

ATP-POOL-BESTIMMUNGEN UND
KONFORMATIONSÄNDERUNGEN WÄHREND DES
ENTWICKLUNGSVERLAUFES VON
SCENEDESMUS OBLIQUUS
IN SYNCHRONKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARGRET SCHÄFER

aus Bad Salzschlirf

Marburg/Lahn 1975

ATP-POOL-BESTIMMUNGEN UND
KONFORMATIONSÄNDERUNGEN WÄHREND DES
ENTWICKLUNGSVERLAUFES VON
SCENEDESMUS OBLIQUUS
IN SYNCHRONKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



von

MARGRET SCHÄFER

aus Bad Salzschlirf

Marburg/Lahn 1975



Vom Fachbereich Biologie der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 30. April 1975

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 1975

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Senger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Schönbohm

1.	Einleitung	1
2.1.	Die Entstehung der Sprache	2
2.2.	Die Entwicklung der Sprache	3
2.3.	Die Funktion der Sprache	4
3.1.	Die Lautsprache	5
3.2.	Die Schriftsprache	6
4.1.	Die Bedeutung der Sprache	7
4.2.	Die Rolle der Sprache	8
5.1.	Die Sprache in der Gesellschaft	9
5.2.	Die Sprache in der Kultur	10
6.1.	Die Sprache in der Wissenschaft	11
6.2.	Die Sprache in der Kunst	12
7.1.	Die Sprache in der Politik	13
7.2.	Die Sprache in der Religion	14
8.1.	Die Sprache in der Medizin	15
8.2.	Die Sprache in der Psychologie	16
9.1.	Die Sprache in der Pädagogik	17
9.2.	Die Sprache in der Philosophie	18
10.1.	Die Sprache in der Ethik	19
10.2.	Die Sprache in der Ästhetik	20
11.1.	Die Sprache in der Soziologie	21
11.2.	Die Sprache in der Anthropologie	22
12.1.	Die Sprache in der Biologie	23
12.2.	Die Sprache in der Chemie	24
13.1.	Die Sprache in der Physik	25
13.2.	Die Sprache in der Mathematik	26
14.1.	Die Sprache in der Informatik	27
14.2.	Die Sprache in der Technik	28
15.1.	Die Sprache in der Wirtschaft	29
15.2.	Die Sprache in der Rechtswissenschaft	30
16.1.	Die Sprache in der Geschichte	31
16.2.	Die Sprache in der Geographie	32
17.1.	Die Sprache in der Meteorologie	33
17.2.	Die Sprache in der Astronomie	34
18.1.	Die Sprache in der Zoologie	35
18.2.	Die Sprache in der Botanik	36
19.1.	Die Sprache in der Tierwelt	37
19.2.	Die Sprache in der Pflanzenwelt	38
20.1.	Die Sprache in der Mineralogie	39
20.2.	Die Sprache in der Geologie	40
21.1.	Die Sprache in der Paläontologie	41
21.2.	Die Sprache in der Archäologie	42
22.1.	Die Sprache in der Ethnologie	43
22.2.	Die Sprache in der Volkskunde	44
23.1.	Die Sprache in der Folklore	45
23.2.	Die Sprache in der Volksmusik	46
24.1.	Die Sprache in der Volkskunst	47
24.2.	Die Sprache in der Volksliteratur	48
25.1.	Die Sprache in der Volksreligion	49
25.2.	Die Sprache in der Volksmedizin	50
26.1.	Die Sprache in der Volksheilkunde	51
26.2.	Die Sprache in der Volkspsychologie	52
27.1.	Die Sprache in der Volksphilosophie	53
27.2.	Die Sprache in der Volksethik	54
28.1.	Die Sprache in der Volksästhetik	55
28.2.	Die Sprache in der Volkskunst	56
29.1.	Die Sprache in der Volksarchitektur	57
29.2.	Die Sprache in der Volkskunst	58
30.1.	Die Sprache in der Volksmusik	59
30.2.	Die Sprache in der Volksliteratur	60
31.1.	Die Sprache in der Volksreligion	61
31.2.	Die Sprache in der Volksmedizin	62
32.1.	Die Sprache in der Volksheilkunde	63
32.2.	Die Sprache in der Volkspsychologie	64
33.1.	Die Sprache in der Volksphilosophie	65
33.2.	Die Sprache in der Volksethik	66
34.1.	Die Sprache in der Volksästhetik	67
34.2.	Die Sprache in der Volkskunst	68
35.1.	Die Sprache in der Volksarchitektur	69
35.2.	Die Sprache in der Volkskunst	70
36.1.	Die Sprache in der Volksmusik	71
36.2.	Die Sprache in der Volksliteratur	72
37.1.	Die Sprache in der Volksreligion	73
37.2.	Die Sprache in der Volksmedizin	74
38.1.	Die Sprache in der Volksheilkunde	75
38.2.	Die Sprache in der Volkspsychologie	76
39.1.	Die Sprache in der Volksphilosophie	77
39.2.	Die Sprache in der Volksethik	78
40.1.	Die Sprache in der Volksästhetik	79
40.2.	Die Sprache in der Volkskunst	80
41.1.	Die Sprache in der Volksarchitektur	81
41.2.	Die Sprache in der Volkskunst	82
42.1.	Die Sprache in der Volksmusik	83
42.2.	Die Sprache in der Volksliteratur	84
43.1.	Die Sprache in der Volksreligion	85
43.2.	Die Sprache in der Volksmedizin	86
44.1.	Die Sprache in der Volksheilkunde	87
44.2.	Die Sprache in der Volkspsychologie	88
45.1.	Die Sprache in der Volksphilosophie	89
45.2.	Die Sprache in der Volksethik	90
46.1.	Die Sprache in der Volksästhetik	91
46.2.	Die Sprache in der Volkskunst	92
47.1.	Die Sprache in der Volksarchitektur	93
47.2.	Die Sprache in der Volkskunst	94
48.1.	Die Sprache in der Volksmusik	95
48.2.	Die Sprache in der Volksliteratur	96
49.1.	Die Sprache in der Volksreligion	97
49.2.	Die Sprache in der Volksmedizin	98
50.1.	Die Sprache in der Volksheilkunde	99
50.2.	Die Sprache in der Volkspsychologie	100

INHALT

	Seite
1. THEORETISCHE EINFÜHRUNG	1
1.1. Die Photophosphorylierung	1
1.1.1. Nicht-zyklische, zyklische und pseudo-zyklische Photophosphorylierungen	1
1.1.2. Theorie der chemischen Kopplung	8
1.1.3. Chemiosmotische Theorie	9
1.2. Hemmstoffe der Photophosphorylierung	12
1.3. Problematik der Photophosphorylierungsmessungen in lebenden Zellen	17
1.4. Lichtabhängige Konformationsänderungen von Chloroplasten in vitro und in vivo	19
1.4.1. Ursachen der Konformationsänderungen	20
1.4.2. Methoden zur Messung der Konformationsänderungen	22
1.4.3. Beziehungen zwischen Konformationsänderungen und den Photophosphorylierungen	23
1.5. Protonenaufnahme bei Belichtung	26
1.6. Synchronkulturen einzelliger Grünalgen	27
2. ZIELSETZUNG	29
3. METHODEN	31
3.1. Objekte und Anzucht	31
3.2. Messungen des ATP-Gehaltes ganzer Zellen bei Dunkel-Licht-Wechseln	32
3.2.1. Versuchsanordnung	32
3.2.2. ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase-Methode	33
3.3. Bestimmung lichtinduzierter Struktur- und Volumenänderungen mit Hilfe der Streulichtmeßtechnik	36
3.3.1. Meßmethodik	36
3.3.2. Anaerobe Bedingungen	41

	Seite
3.3.3.	Zellfreie Systeme 42
3.3.4.	Aktionsspektren 42
3.4.	Bestimmungen der Volumenänderungen mit dem Coulter Counter 43
3.5.	Versuchsbedingungen zur Abgrenzung der Phosphorylierungsarten gegeneinander 44
3.6.	Bestimmung der Bezugsparameter 45
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION 46
4.1.	ATP-Pool-Bestimmungen bei <u>Scenedesmus</u> 46
4.1.1.	Änderungen des ATP-Spiegels ganzer Zellen synchroner <u>Scenedesmus</u> -Kulturen bei Dunkel-Licht-Wechsel 46
4.1.1.1.	Der Einfluß aerober und anaerober Bedingungen 46
4.1.1.2.	Anteil der oxidativen Phosphorylierung 52
4.1.1.3.	Anteil der zyklischen und nicht-zyklischen Photophosphorylierung 57
4.1.2.	Verhalten des ATP-Spiegels unbelichteter Proben während des Entwicklungszyklus unter verschiedenen Bedingungen 63
4.1.3.	Änderungen des ATP-Spiegels während des Entwicklungszyklus 65
4.1.4.	Änderungen der Δ ATP-Werte während des Entwicklungszyklus 67
4.2.	Lichtabhängige Konformationsänderungen bei <u>Scenedesmus</u> , <u>Chlorella</u> und <u>Chlamydomonas</u> 71
4.2.1.	Messung der Konformationsänderungen als Streulichtänderung 71
4.2.2.	Die schnelle Extinktionsänderung (Phase 1) 76
4.2.2.1.	Abhängigkeit von der Suspensionsdichte und Meßtechnik 77
4.2.3.	Die langsame Extinktionsänderung (Phase 2) 85
4.2.3.1.	Abhängigkeit von der Meßtechnik und der Wellenlänge des Meßlichtes 85

	Seite
4.2.3.2. Abhängigkeit von der Wellenlänge und Intensität des Anregungslichtes	88
4.2.3.3. Hemmstoffzugabe	90
4.2.4. Lichtabhängige Konformationsänderungen während des Entwicklungszyklus von <u>Scenedesmus</u> und <u>Chlorella</u>	91
4.2.5. Verhalten lichtinduzierter Konfor- mationsänderungen unter anaeroben Bedingungen	96
4.2.6. Verhalten lichtinduzierter Konfor- mationsänderungen in zellfreien Systemen	100
4.2.7. Lichtinduzierte Konformationsänderungen bei einer <u>Scenedesmus</u> -Mutante ohne Photosystem II	105
5. SCHLUSSFOLGERUNGEN	106
6. ZUSAMMENFASSUNG	110
7. LITERATUR	113

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AA	Antimycin A
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DSPD	Disalicylidenpropylendiamin
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
P	Phosphorylierung
P _i	anorganisches Phosphat
PCV	packed cell volume (dichtest gepacktes Zellvolumen)
PMS	5-Methylphenaziniummethylsulfat
PP	Photophosphorylierung
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. THEORETISCHE EINFÜHRUNG

1.1. Die Photophosphorylierungen

In der Photosynthese wird Licht in chemische Energie umgesetzt. Dabei werden mit Hilfe von 2 Lichtreaktionen NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert und aus ADP plus anorganischem Phosphat ATP gebildet. Beides wird für die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus benötigt. Darüberhinaus hängen aber auch viele Synthese- und Umbaureaktionen der pflanzlichen Zelle von der ATP-Produktion in der Photosynthese ab, soweit dieser Bedarf nicht von der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien oder durch Substratkettenphosphorylierung gedeckt wird.

1.1.1. Nicht-zyklische, zyklische und pseudo-zyklische Photophosphorylierung

Die n i c h t - z y k l i s c h e P P ist stets mit einer Sauerstoffproduktion und einer CO_2 -Fixierung verbunden. Sie ist mit Sicherheit in vivo und in vitro unter aeroben Bedingungen nachgewiesen. (Literaturhinweise hierzu siehe die Zusammenfassungen von SIMONIS & URBACH, 1973; RAVEN, 1974; TREBST & HAUSKA, 1974). Sie scheint den wesentlichen Energielieferanten für die Dunkelfixierung von CO_2 darzustellen. Die Stöchiometrie von ATP-Bildung zu den transportierten Elektronen wurde an intakten Thylakoidsystemen (broken chloroplasts) als Menge gebundenes Phosphat bei dem Transport von 2 Elektronen vom Wasser zum NADP (P/2e-Quotient) untersucht. Die von ARNON et al. (1957) gefundene Stöchiometrie von 1 Mol ATP pro Mol gebildetem NADP wurde schon bald von IZAWA und GOOD (1968) bezweifelt, da der auch in der Abwesenheit von ADP und P_i ablaufende basale Elektronenfluß nicht berücksichtigt worden war.

In neuerer Zeit werden P/2e-Verhältnisse von ungefähr 1,7 (REEVES & HALL, 1973; WEST & WISKICH, 1973) angegeben, aber auch von 1,2 - 1,4 (HEBER, 1973; HEBER et al., 1975) bei flexibler Kopplung.

Die nicht-zyklische PP läuft in lebenden Zellen immer in Gegenwart von CO_2 und O_2 ab und wird von Licht, das das Photosystem II anregt, angetrieben.

Inhibitoren des nicht-zyklischen Elektronentransportes, wie z.B. DCMU oder DBMIB, hemmen die nicht-zyklische PP.

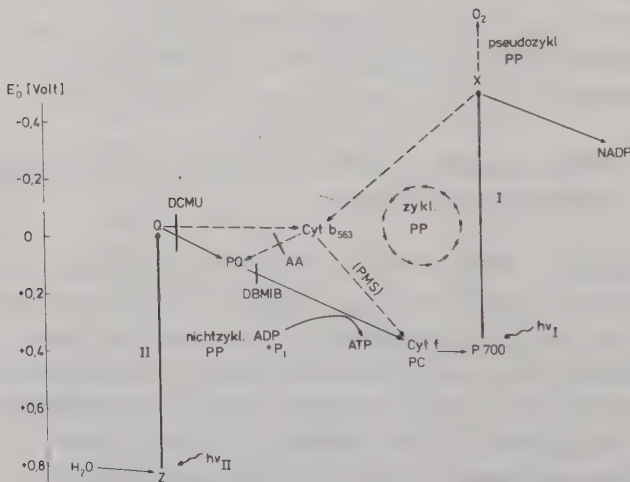


Abb. 1: Hill-Bendall-Diagramm des photosynthetischen Elektronentransportes.

Die zyklische PP kann im Gegensatz zu der nicht-zyklischen PP auch in Abwesenheit von CO_2 und O_2 ablaufen. Sie ist mit dem zyklischen Elektronentransport um Photosystem I gekoppelt und kann daher durch Licht $\lambda > 700 \text{ nm}$ angeregt werden. Ein Gaswechsel ist mit der zyklischen PP nicht verbunden.

Die zyklische PP wurde zuerst in isolierten Chloroplasten nachgewiesen (AVRON & CHANCE, 1966; AVRON et al., 1968); allerdings benötigt sie Cofaktoren wie PMS, Ferredoxin oder Vitamin K₁, um ablaufen zu können. Erst später gelang auch der Nachweis einer endogenen zyklischen PP in isolierten Chloroplasten ohne Cofaktoren, nur in Anwesenheit der Substrate ADP und P_i (FORTI & ROSA, 1972; MIGINIAC- MASLOW et al., 1971; SCHÜRMANN et al., 1971; KAISER & URBACH, 1972, 1974). Allerdings läuft sie im Gegensatz zu der durch Cofaktoren katalysierten zyklischen PP nur in intakten Chloroplasten ab (KAISER & URBACH, 1972).

Über den Weg der Elektronen bei diesem zyklischen Transport in vivo und in vitro bestehen noch Unklarheiten. Es wird angenommen, daß die Ferredoxin-katalysierte zyklische PP in isolierten Chloroplasten über Cytochrom b₅₆₃ verläuft und nahe PS II in die Elektronentransportkette einmündet (TAGAWA et al., 1963a), während die PMS-katalysierte PP nahe PS I eintritt (FORTI & ZANETTI, 1969; GROMET-ELHANAN, 1969). Dabei ist der PMS-katalysierte zyklische Elektronentransport wesentlich schneller als der Ferredoxin-katalysierte, da ja der relativ langsame Elektronenübergang vom reduzierten Plastochinon zum Plastocyanin/Cytochrom f wegfällt. Nur die Ferredoxin-katalysierte zyklische PP ist durch AA hemmbar (TAGAWA et al., 1963a). Da AA auch die oxidative Phosphorylierung am Cytochrom b₆ in der Atmungskette hemmt (s.K. 1.2.), wird daraus auf eine Teilnahme von Cytochrom b₅₆₃ an der zyklischen PP geschlossen. Die zyklische PP in vivo entspricht daher in ihrem Verlauf wohl eher der Ferredoxin-katalysierten zyklischen PP in isolierten Chloroplasten (FORTI & PARISI, 1963).

Der genaue Ort der Einmündung des zyklischen Elektronentransportes in die Elektronentransportkette ist vermutlich das Plastochinon (URBACH & KAISER, 1972;

BIGGINS, 1974), was aus der Hemmbarkeit der zyklischen PP durch DBMIB hervorgeht (BÖHME et al., 1971). DBMIB hemmt den Elektronentransport zwischen PS II und PS I hinter Plastochinon. Dagegen ist das Plastochinon weder an der endogenen zyklischen PP beteiligt, obwohl dies auch eine Ferredoxin-katalysierte, durch AA hemmbare zyklische PP ist (FORTI & ROSA, 1972), noch an der durch PMS katalysierten.

Kennzeichen der zyklischen PP sind:

- a) nicht hemmbar durch DCMU-Konzentrationen, die den nicht-zyklischen Elektronentransport unterbinden (s. K.1.2.)
- b) hemmbar durch AA und DSPD
- c) anregbar durch Photosystem I-Licht ($\lambda > 700\text{nm}$)
- d) Lichtsättigung bei niedrigen Lichtintensitäten (TAGAWA et al., 1963; SIMONIS, 1967; ULLRICH & SIMONIS, 1969; TANNER et al., 1969; URBACH & KAISER, 1972).

In vivo konnte eine zyklische PP zumindest unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden (URBACH & SIMONIS, 1964; FORTI & PARISI, 1963; NULTSCH, 1966; TANNER et al., 1966; URBACH & GIMMLER, 1970; URBACH & KAISER, 1972), allerdings in der Regel nur nach Ausschalten der PS II-Aktivität durch Hemmstoffe, Wellenlänge des Anregungslichtes oder reine Stickstoffatmosphäre. Unsicher ist noch immer, ob eine zyklische PP in vivo unter aeroben Bedingungen ablaufen kann.

Die zyklische PP soll genügend ATP für die CO_2 -Fixierung bereitstellen.

Es wurde aber diskutiert, ob diese PP überhaupt für die CO_2 -Assimilation notwendig ist.

KANDLER und Mitarbeiter (1966) schlossen aus Versuchen mit Chlorella, daß keine direkte Beziehung zwischen der zyklischen PP und der CO_2 -Fixierung besteht, da beide Prozesse eine unterschiedliche Lichtsättigung und Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren zeigten.

Dies wurde von RAVEN (1969) und SIMONIS (1967) bestätigt. URBACH et al. (1970) und MIGINIAC-MASLOW (1971) vermuten auf Grund von Versuchen an Algen bzw. isolierten Spinatchloroplasten, daß die CO_2 -Fixierung nicht von der ATP-Produktion der zyklischen PP abhängt, sondern von bisher noch unbekannten energiereichen Zwischenstoffen.

Dagegen bestätigen Hemmversuche mit AA bei isolierten Chloroplasten die Ansicht, daß das ATP aus der zyklischen PP unbedingt notwendig für die CO_2 -Assimilation im Calvin-Zyklus sei, zusammen mit der nicht-zyklischen PP, wenn ein hohes ATP/NADPH-Verhältnis entstehen soll, das die Umwandlung von Phosphoglycerat in Zuckerphosphate beschleunigt (SCHÜRMANN et al., 1971).

KLOB et al. (1972) sehen die Aufgabe der zyklischen PP in der Lieferung von zusätzlichem ATP für den Start der CO_2 -Fixierung unter anaeroben Bedingungen, während in Luft eine andere Energiequelle, eventuell die oxidative P die zyklische PP ersetzt.

Die widersprüchlichen Befunde bezüglich dieser beiden Prozesse lassen sich vielleicht aus einem Zusammenhang der nötigen Hemmstoffmenge und der benutzten Lichtintensität erklären, der nicht genügend beachtet wurde (SCHÜRMANN et al., 1971).

Daß bis jetzt noch keine zyklische PP in vivo unter aeroben Bedingungen mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte, beruht vor allem auf experimentellen Schwierigkeiten bei der Abgrenzung gegen andere Phosphorylierungen.

Die physiologische Bedeutung der zyklischen PP könnte, außer der umstrittenen ATP-Lieferung für den Calvin-Zyklus, in der Energielieferung für die Aufnahme organischer Substanzen (WIESSNER, 1965 ;TANNER et al., 1966) oder Ionen (JESCHKE, 1969; RAVEN, 1969) im Licht,

Proteinsynthese (TANNER et al., 1969) etc. liegen.

HEBER (1969, 1973 a,b) und KRAUSE (1973) bezweifeln auf Grund von Messungen des Phosphorylierungspotentials bei höheren Pflanzen, daß eine zyklische PP in vivo in Gegenwart von Sauerstoff eine Rolle spielen kann, da Sauerstoff den zyklischen Elektronentransport zugunsten eines pseudo-zyklischen unterbricht, der dann zusätzlich ATP produziert.

Auch andere Autoren (GIMMLER, 1973) sprechen der zyklischen PP eine Bedeutung in vivo ab, während vor allem die Arbeitsgruppe um ARNON (SCHÜRMANN et al., 1971) an eine Rolle der zyklischen PP in vivo glaubt.

Möglicherweise ist der zyklische Elektronenfluß ein Relikt aus der evolutionären Vergangenheit und ist unter aeroben Bedingungen voll durch andere Phosphorylierungen ersetzt (KRAUSE & HEBER, 1971). Je nach Intensität des Anregungslichtes könnte aber auch der Anteil der zyklischen PP an der ATP-Produktion schwanken, da die zyklische PP im Gegensatz zur nicht-zyklischen schon bei geringen Lichtintensitäten gesättigt ist (BEDELL & GOVINDJEE, 1973).

Noch umstrittener ist der Anteil der p s e u d o - c y c l i s c h e n P P an der lichtabhängigen ATP-Produktion.

Die pseudo-zyklische PP ist mit dem nicht-zyklischen Elektronentransport gekoppelt, nur werden die Elektronen hinter PS I nicht auf NADP, sondern auf molekularen Sauerstoff übertragen (siehe Abb. 1). Es werden genau so viele Moleküle Sauerstoff dabei verbraucht wie bei der Wasserspaltung entstehen, so daß letzten Endes auch der pseudo-zyklische Elektronentransport nicht mit einem Gaswechsel verbunden ist.

Die pseudo-zyklische PP wurde bis jetzt vor allem in vitro gefunden (ARNON et al., 1961; FORTI & JAGENDORF, 1961; NOBEL, 1961; HEBER, 1969).

In intakten und osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten existiert eine endogene pseudo-zyklische PP (KAISER & URBACH, 1972).

In vivo scheint sie unter Bedingungen ähnlich denen der nicht-zyklischen PP existieren zu können (HEBER, 1969; 1973; KRAUSE, 1973); da sie aber ebenfalls durch DCMU hemmbar ist, ist sie nur schwer von der nicht-zyklischen PP abzugrenzen.

Einige Möglichkeiten zur Messung dieses Phosphorylierungstyps sind: Versuche mit radioaktiv markiertem Sauerstoff (JACKSON & VOLK, 1969), Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz durch geringe Sauerstoffmengen (HEBER & FRENCH, 1968; KRAUSE, 1973), Ionenaufnahme (HOCH et al., 1963) und Messungen lichtabhängiger Volumenänderungen (HEBER, 1973 a, b). RAVEN (1969) glaubt mit Hilfe von Messungen an P_{700} und Cytochrom f bei unterschiedlichen Sauerstoffmengen eine zyklische und pseudo-zyklische PP in vivo bei Algen nachweisen zu können, wenn die Photosynthese durch niedrige Lichtintensitäten begrenzt ist.

Fehlen von CO_2 ermöglicht in Gegenwart von Sauerstoff eventuell einen pseudo-zyklischen Elektronentransport, da der nicht-zyklische Elektronentransport nicht zusammenbricht (HEBER & FRENCH, 1968). Die pseudo-zyklische PP ist relativ früh lichtgesättigt (HEBER, 1969) und schon Sauerstoffspuren genügen, sie ablaufen zu lassen (ULLRICH & SIMONIS, 1969).

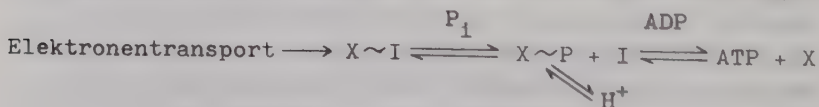
Nach einem Modell von HEBER (1973) bewirkt der NADPH-Spiegel eine Regulation zwischen den drei möglichen PP. Steigt die Menge an vorhandenem NADPH an, z.B. bei sehr geringem ATP-Angebot, dient der Sauerstoff auf Grund seiner Elektronenaffinität ersatzweise als Elektronenakzeptor. Durch die mit dem pseudo-zyklischen Elektronentransport gekoppelte P steigt die ATP-Produktion wieder an, wodurch wegen der nun wieder verstärkt ablaufenden CO_2 -Fixierung der NADPH-Spiegel sinkt, ein

nicht-zyklischer Elektronentransport abläuft und der Transport zum Sauerstoff wieder unterbunden wird. Die geringere Affinität von Sauerstoff in bezug auf CO_2 verhindert eine echte Konkurrenz zwischen beiden. Der Akzeptor, der den zyklischen Elektronentransport vermittelt, hat eine noch geringere Elektronenaffinität, so daß eine zyklische PP nur dann ablaufen kann, wenn beide anderen Akzeptoren abgesättigt sind oder Sauerstoff oder CO_2 fehlen.

Der Mechanismus der ATP-Bildung bei der Photosynthese ist heute noch umstritten.

1.1.2. Theorie der chemischen Kopplung

Nach der Theorie der chemischen Kopplung, die von SLATER 1953 für die Verhältnisse an den Mitochondrien entwickelt und später auf die Chloroplasten übertragen wurde (SLATER, 1967), erfolgt die ATP-Bildung über ein oder mehrere energiereiche Zwischenprodukte, die die frei werdende Energie der Redox-Reaktionen im Elektronentransport übernehmen. Die so gebundene Energie wird zur ATP-Bildung aus ADP und P_i verwendet. Die Energie liegt in der Reaktivität der kovalenten Bindungen.



$\text{X} \sim \text{I}$ = energiereiches Zwischenprodukt

$\text{X} \sim \text{P}$ = phosphoryliertes Zwischenprodukt

(nach ZELITCH, 1971, abgeändert).

Diese Reaktion lehnt sich an bekannte Mechanismen der Substratkettenphosphorylierung an.

1972 stellte CHANCE als verfeinerte Form dieser Theorie die Konformationshypothese vor. Die Energie des Zwischenproduktes ist danach nicht in einer kovalenten Bindung lokalisiert, sondern breitet sich über die beteiligten Proteinmoleküle durch Änderungen des Spannungszustandes dieses Moleküls aus.

1.1.3. Chemiosmotische Theorie

Demgegenüber steht die von MITCHELL (1961) an Mitochondrien entwickelte chemiosmotische Theorie (MITCHELL, 1961, 1966).

WITT wandte sie 1968 auf die Verhältnisse an Chloroplasten an (SCHLIEPHAKE et al., 1968; JUNGE et al., 1969). Im Unterschied zu der Theorie von SLATER existiert keine chemische Kopplung von Elektronentransport und ATP-Bildung, sondern die Energie der Redox-Reaktionen führt zum Aufbau eines Protonen- oder Ladungsgradienten, der sich über die Membran ausbreitet. Voraussetzungen sind zwei durch eine Membran abgetrennte Kompartimente; die Membran darf für Protonen nicht permeabel sein.

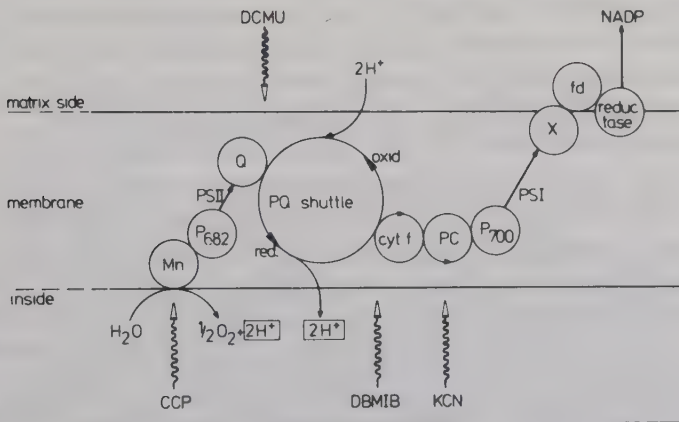


Abb. 2: Zickzack-Schema des gerichteten photosynthetischen Elektronentransportes quer durch die Thylakoidmembran. Aus TREBST (1974).

Dem lichtabhängigen Protonentransport über die Thylakoidmembran von außen nach innen ist ein Elektronentransport entgegengerichtet (siehe Abb. 2).

Elektronentransport $\rightleftharpoons$ H⁺ $\rightleftharpoons$ ATP

Dieser Protonen- oder Ladungstransport entspricht der Energiekonservierung. Die ATP-Bildung kann zeitlich und räumlich getrennt von der Energiekonservierung, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Theorie der chemischen Kopplung, an irgendwelchen Stellen der Membran über reversible ATPasen durch einen Protonen- oder Ladungsausgleich zwischen Thylakoidinnen- und -außenraum. erfolgen.

Diese Theorie erfordert also einen gerichteten Transport und demnach eine bestimmte Anordnung der Redox-Systeme in der Thylakoidmembran. Es gibt experimentelle Beweise für die chemiosmotische Theorie : So konnten JAGENDORF & URIBE (1967) im Dunkeln nach Blitzlichtbelichtung in Chloroplasten eine ATP-Produktion feststellen; NEUMANN & JAGENDORF (1965) erzeugten in verdunkelten Chloroplasten allein durch pH-Änderungen eine ATP-Produktion. Ebenso konnten pH-Gradienten von 3,5 zwischen innen und außen und Ladungs-Gradienten bei Belichtung experimentell bestimmt werden (JUNGE et al., 1969). Ein gerichteter Elektronentransport wurde mit Hilfe von Antikörperreaktionen, molekularen Sonden und durch die Verwendung hydrophiler und lipophiler Redox-Systeme teilweise nachgewiesen (TREBST, 1974). Die Energiekonservierungsstelle ist der gegenläufige Elektronen- und Protonentransport durch die Membran; eine native Stelle ist zwischen Plastochinon und Photosystem I festgelegt (TREBST & HAUSKA, 1974). Die Arbeitsgruppe um TREBST konnte zeigen (BÖHME et al., 1971), daß auch künstliche Energiekonservierungsstellen induziert werden können, wenn Elektronendonatoren verwendet werden, die gleichzeitig Protonen freisetzen. Noch einfacher sind die Verhältnisse, wenn man eine Ladungstrennung durch die Membran annimmt (JUNGE et al., 1969).

Für die CO₂-Reduktion und die Regeneration des Ribulose-diphosphates werden im Calvin-Zyklus zwei reduzierte

Äquivalente und drei Moleküle ATP benötigt; bei der Saccarose- und Stärkesynthese wird ebenfalls ATP für die Bildung glykosidischer Bindungen benötigt. Auch wenn man diese und andere in der Zelle ablaufende ATP-verbrauchende Synthesen vernachlässigt, werden mindestens drei Moleküle ATP/ zwei Moleküle NADPH benötigt. Der $P/2e$ -Quotient muß daher größer als 1 sein.

Wenn man annimmt, daß die Theorie der chemischen Kopplung zutrifft, muß man bei einem $P/2e$ -Quotienten zwischen 1 und 2 mehrere Kopplungsstellen im Elektronentransport annehmen. Eine Kopplungsstelle im nicht-zyklischen Elektronentransport, die ziemlich gesichert erscheint, liegt zwischen Plastochinon und Cytochrom f/ Plastocyanin (BÖHME & CRAMER, 1972; TREBST & REIMER, 1973). Da diese eine Kopplungsstelle aber nicht ausreicht, den ATP-Bedarf der CO_2 -Fixierung zu decken, bleiben zwei Möglichkeiten:

- a) das fehlende ATP wird durch eine zusätzlich ablaufende zyklische oder pseudo-zyklische PP geliefert;
- b) im nicht-zyklischen Elektronentransport muß mehr als eine Kopplungsstelle vorhanden sein.

Sie wurde schon von YAMASHITA & BUTLER (1969) gefordert. Eine solche Kopplungsstelle zwischen dem wasserspaltenden System und PS II wurde auch von BÖHME et al. (1971) vermutet und in isolierten Chloroplasten nachgewiesen (REEVES & HALL, 1973; WEST & WISKICH, 1973). GIMMLER (1973) fand mit Hilfe von Hemmstoffversuchen und Messungen von Teilsequenzen des Elektronentransportes bei der Grünalge Dunaliella eine zweite Kopplungsstelle nahe PS II. NEUMANN et al. (1971) dagegen diskutieren zwei Kopplungsstellen zwischen den beiden Photosystemen. Eine mögliche Kopplungsstelle vor PS II und eine dafür in Frage kommende Substanz

konnte bis jetzt aber noch nicht identifiziert werden. Zwei Kopplungsstellen der nicht-zyklischen PP in einzelligen Algen finden KANDLER & TANNER (1966), KYLIN & TILLBERG (1967a) und SIMONIS (1967).

Es ist auch möglich, daß wohl zwei Kopplungsstellen im nicht-zyklischen Elektronentransport existieren, dennoch aber nicht 4 ATP/2e gebildet werden.

Die Kopplungsstellen der zyklischen und pseudo-zyklischen PP könnten identisch mit der Kopplungsstelle nach Plastochinon sein (OKKEH et al., 1975); Versuche an isolierten Chloroplasten brachten aber dafür noch keine sicheren Beweise. Für die zyklische PP wurde eine weitere Kopplungsstelle zwischen PS I und der Einmündungsstelle in den nicht-zyklischen Elektronentransport postuliert (HAUSKA et al., 1970; BÖHME et al., 1971; KYLIN et al., 1972; NEUMANN et al., 1972).

Diese Probleme stellen sich nicht, wenn man die chemiosmotische Theorie zugrunde legt.

1.2. Hemmstoffe der Photophosphorylierung

Zur Untersuchung des photosynthetischen Elektronentransportes und der Phosphorylierungen werden in vivo und in vitro oft Hemmstoffe und Entkoppler eingesetzt, um Teile des Elektronentransportes auszuschalten oder die ATP-Bildung vom Elektronentransport zu entkoppeln.

Einige der am häufigsten bei lebenden Zellen verwendeten Entkoppler und Inhibitoren sind :

- a) nicht-zyklische PP : DCMU, DBMIB
- b) zyklische PP : AA, DSPD (GIMMLER et al., 1968), Desaspidin (SIMONIS, 1967), CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) (URBACH & KAISER, 1972), DBMIB, DCMU in hohen Konzentrationen (BEDELL & GOVINDJEE, 1973).

Oft ist es eine Frage der verwendeten Konzentrationen des Hemmstoffes, wo er angreift. Nicht alle Hemmstoffe können ohne weiteres für alle lebenden Zellen verwendet werden, da manche Organismen während ihres Entwicklungszyklus unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Hemmstoffen zeigen oder gar keine Hemmung mehr aufweisen; dies ist zum Beispiel bei der 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus und Chlorella pyrenoidosa der Fall. Zu diesem Zeitpunkt wirken eine Anzahl Stoffe nicht hemmend, da sie auf Grund von Penetrationsschwierigkeiten nicht in die Zelle gelangen können (FRICKEL-FAULSTICH & SENGGER, 1972; FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

Im folgenden soll nur auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hemmstoffe näher eingegangen werden (Abb. 1).

D C M U (3-(3,4-Dichlorphenyl-1, 1-dimethylharnstoff) ist einer der am häufigsten verwendeten Photosynthesehemmstoffe und scheint zwischen PS II und Plastochinon in den nicht-zyklischen Elektronentransport einzugreifen (DUYSENS & SWEERS, 1963; VAN RENSEN, 1971) und hemmt damit PS II (BISHOP, 1958). Konzentrationen bis etwa 1×10^{-5} M (bei Algen) hemmen nur den nicht-zyklischen Elektronentransport und damit die nicht-zyklische PP. (KYLIN et al., 1967; ULLRICH, 1971; URBACH & KAISER, 1972). Erhöht man die Konzentration auf 1×10^{-4} M, wird auch die zyklische PP gehemmt; auf welche Weise dies geschieht, ist noch unbekannt (IZAWA, 1968; VAN RENSEN, 1971; BEDELL & GOVINDJEE, 1973, GOOD & IZAWA, 1973; BORNEFELD & SIMONIS, 1974).

Diese Konzentrationen hemmen auch die PMS-katalysierte zyklische PP, beeinflussen aber auch gleichzeitig schon die Atmung geringfügig (OELZE-KAROW & BUTLER, 1971).

URBACH & GIMMLER (1970) berichten für Ankistrodesmus

eine Hemmung der nicht-zyklischen PP ab 5×10^{-7} M und der zyklischen PP ab 10^{-6} M. Um jedoch bei den einzelligen Grünalgen Scenedesmus und Chlorella eine vollständige Hemmung des nicht-zyklischen Elektronentransportes zu erreichen, müssen die Konzentrationen höher liegen.

KYLIN & OKKEH (1974) wiesen durch Titration mit DCMU drei verschiedene Reaktionen der DCMU-Hemmung bei Scenedesmus obtusiusculus nach. Die Stöchiometrie zwischen diesen drei Reaktionen ist 2:1:1, woraus auf vier Phosphorylierungsstellen in vivo geschlossen wird, nämlich zwei Stellen der nicht-zyklischen, eine der pseudo-zyklischen und eine der zyklischen PP, wobei die der pseudo-zyklischen PP mit einer der nicht-zyklischen übereinstimmt.

D B M I B (2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon =Dibromothymochinon) ist ebenfalls ein Hemmstoff des nicht-zyklischen Elektronentransportes (TREBST et al., 1970), dessen Hemmstelle allgemein an der reduzierenden Seite von Plastochinon angenommen wird (BÖHME et al., 1971); wahrscheinlich wirkt es als Antagonist zu Plastochinon (BÖHME & CRAMER, 1972a).

Der Elektronenausfluß aus dem Plastochinon-Pool ist durch Konzentrationen bis 10^{-5} M und darunter gehemmt; höhere DBMIB-Konzentrationen dagegen ändern die Wirkung dieses Hemmstoffes, der sich dann wie ein Hill-Akzeptor verhält.

Eine Hemmung der nicht-zyklischen und zyklischen PP bei Algen in vivo wurde schon von URBACH & KAISER (1972) und GIMMLER (1973) berichtet. Sie weisen darauf hin, daß in vivo und in vitro nur die durch Ferredoxin-katalysierte zyklische PP durch DBMIB gehemmt wird; dies bedeutet, daß das Plastochinon an dem zyklischen Elektronentransport in vivo be-

teiligt ist, nicht aber an der PMS-katalysierten zyklischen PP.

A N T I M Y C I N A ist ein Hemmstoff der zyklischen PP und der Atmungskette in vivo.

Obwohl dieses Antibioticum schon recht lange bekannt ist, ist seine Angriffsstelle bei der zyklischen PP noch immer sehr umstritten und auch die Ergebnisse bezüglich seiner Wirkungsweise sind sehr widersprüchlich.

TAGAWA und Mitarbeiter (1963) fanden, daß AA als Hemmstoff der Ferredoxin-katalysierten zyklischen PP in Chloroplasten benutzt werden kann, während gleiche Konzentrationen weder die nicht-zyklische, noch die durch andere Cofaktoren katalysierte zyklische PP beeinflussen.

Andere Autoren beobachteten allerdings auch gleichzeitig eine Hemmung der nicht-zyklischen PP bei niedrigen Lichtintensitäten (IZAWA et al., 1966; DRECHSLER et al., 1969).

Die Hemmung der zyklischen, Ferredoxin-katalysierten PP konnte bei isolierten Chloroplasten (ARNON et al., 1964; BÖHME et al., 1971), aber auch an ganzen Zellen bei Vorgängen, die ihre Energie nur aus der zyklischen PP erhalten konnten (URBACH & SIMONIS, 1964; TANNER et al., 1965; NULTSCH, 1966; KYLIN et al., 1967), bestätigt werden.

Daraus wurde geschlossen, daß Ferredoxin auch in vivo an der zyklischen PP beteiligt sein muß.

Die endogene zyklische PP ist ebenfalls durch AA hemmbar (siehe Kap. 1.1.1.).

Die Hemmstelle des AA bei der oxidativen P liegt zwischen den Cytochromen b_6 und c. Daher wurde angenommen, daß das Cytochrom b_{563} an dem zyklischen

Elektronentransport in vivo beteiligt ist und dort auch die Angriffsstelle des AA liegt (SIMONIS, 1964). IZAWA et al. (1966) und HIND & OLSON (1966) dagegen vermuten die Hemmstelle nahe PS I bei Cytochrom f, wobei für den basalen Elektronenfluß ein bypass existieren soll, da die photosynthetische Sauerstoffentwicklung nicht gehemmt ist. DRECHSLER et al. (1969) beobachteten aber auch eine Hemmung des basalen Elektronentransportes durch AA, KYLIN et al. (1967) eine Hemmung der Sauerstoffentwicklung.

Umstritten ist auch der Einfluß des AA auf die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus: Beobachtet wurden sowohl eine Erhöhung (CHAMPIGNY & GIBBS, 1969; SCHACTER & BASSHAM, 1972), eine totale Hemmung (SCHÜRMANN et al., 1971), als auch eine Nichtbeeinflussung der CO_2 -Fixierung (TANNER et al., 1966) bei AA-Konzentrationen, die die zyklische PP hemmten. SCHÜRMANN et al. (1971) vermuten die Ursache dieser widersprüchlichen Befunde in einer engen Abhängigkeit der wirksamen AA-Konzentrationen von der verwendeten Lichtintensität (s. K.1.1.1.). DRECHSLER et al. (1969) nehmen für AA zwei verschiedene Reaktionsmöglichkeiten in isolierten Chloroplasten an. Bei niedrigen Konzentrationen hemmt es den Elektronentransport und damit gleich stark sowohl ATP-Bildung als auch die NADP-Reduktion. Bei hohen Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$) wirkt es entkoppelnd und behindert die ATP-Bildung stärker als die NADP-Reduktion.

Uneinheitlich sind auch die Beobachtungen bezüglich des Einflusses von AA auf die Atmung.

Normalerweise hemmt AA die oxidative P und den Sauerstoffverbrauch völlig (SIMONIS, 1966). TANNER et al. (1965) dagegen beobachteten eine Steigerung der Atmung um rund 20% bei Chlorella.

N A T R I U M A Z I D (NaN_3) greift an den Enzymreaktionen, die zur ATP-Bildung führen, an und wirkt daher entkoppelnd. Diese Wirkung ist für die oxidative P gesichert; ob NaN_3 auch einen Einfluß auf die PP ausübt, ist unklar. Während SIMONIS (1964) und SCHÖNBOHM (1969) eine Entkopplung des Elektronentransportes von der PP fanden, konnten BEDELL & GOVINDJEE (1973) nur eine Hemmung der oxidativen P beobachten.

Hohe NaN_3 -Konzentrationen rufen Veränderungen unbekannter Art im Calvin-Zyklus hervor (BEDELL & GOVINDJEE, 1973).

1.3. Problematik der Photophosphorylierungsmessungen in lebenden Zellen

Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit dem ATP-Umsatz in isolierten Chloroplasten bei unterschiedlichen Bedingungen (Literatur hierzu siehe FORTI et al., 1972).

Dagegen sind die Vorgänge in lebenden Zellen wegen ihrer viel größeren Komplexität wesentlich schwerer zu untersuchen. Die an isolierten Chloroplasten gewonnenen Ergebnisse lassen sich nicht ohne weiteres auf die Bedingungen in vivo übertragen, da diese Befunde wesentlich von der Art der Isolation und den zugegebenen Substanzen abhängen und Artefakte nicht auszuschließen sind. Überdies stellt die Zelle ein eng miteinander verbundenes System dar, aus dem nicht problemlos Teile herausgenommen werden können.

Messungen direkter ATP-Umsätze, wie sie in isolierten Chloroplasten nach Zugabe von ADP und anorganischem Phosphat durchgeführt werden können, sind in ganzen Zellen nicht möglich. Dort können nur ATP-Pools bestimmt werden, die die Summe der ATP-verbrauchenden Reaktionen und -produzierenden Reaktionen widerspiegeln. Dabei

ergibt sich die Schwierigkeit der Abgrenzung einzelner ATP-Bildungsvorgänge gegeneinander und gegen die gleichzeitig ablaufenden Verbrauchsreaktionen.

Daher werden meist Messungen der Änderungen von ATP-, ADP- oder P_i -Pools bei Dunkel-Licht-Übergängen unter verschiedenen Bedingungen herangezogen (s. Methodik, K.3.5.), um einen Einblick in die Phosphorylierungsprozesse zu bekommen. So kann z.B. die oxidative P durch eine anaerobe Atmosphäre oder durch Hemmstoffzugabe ausgeschaltet werden. Oft ist jedoch die Wirkung der Hemmstoffe unsicher, oder sie dringen nicht in die Zellen ein.

Die ATP-verbrauchenden Reaktionen können nicht ohne weiteres ausgeschaltet werden und müssen bei der Interpretation berücksichtigt werden. Auf Grund dieser Schwierigkeiten werden meist indirekte Methoden zur Messung der PP angewendet, z.B. die energieabhängige Aufnahme von organischen Substanzen wie Glukose (KANDLER & TANNER, 1966; SENGER, 1970) und Acetat (WIESSNER, 1964) und von Ionen (BARBER, 1968; JESCHKE & SIMONIS, 1969; RAVEN, 1971) im Licht bei unterschiedlichen Bedingungen, Photokinese-Versuche (NULTSCH, 1966), CO_2 -Fixierung unter Photoreduktionsbedingungen (SENGER, 1970) und lichtabhängiger ^{32}P -Einbau in die löslichen organischen und unlöslichen anorganischen Verbindungen (SIMONIS & GIMMLER, 1969).

Seit einigen Jahren werden auch licht-abhängige Konformations- und Volumenänderungen von Thylakoidmembranen und Chloroplasten in ganzen Zellen zur Untersuchung der PP herangezogen (HEBER, 1969, GIMMLER, 1973; KRAUSE, 1973). Auch Mutanten werden zur Untersuchung der PP in vivo benutzt (BISHOP, 1973).

Eine Zusammenfassung der Methoden ist bei URBACH & SIMONIS (1973) zu finden.

Alle diese Methoden haben aber den Nachteil, nur indirekt mit dem Energiestoffwechsel der Zelle verbunden zu sein und nur einen Teil der komplexen Vorgänge darzustellen.

Inwieweit man daraus allgemeinere Schlüsse auf Phosphorylierungsvorgänge ziehen darf, ist nicht sicher zu entscheiden.

1.4. Lichtabhängige Konformations- und Volumenänderungen von Chloroplasten in vivo und in vitro

Lichtinduzierte Konformationsänderungen wurden erstmals von DILLEY & VERNON (1964) an isolierten Chloroplasten beschrieben. Seitdem waren sie Gegenstand vieler Untersuchungen.

Man unterscheidet zwei Möglichkeiten von lichtinduzierten Volumenänderungen, die im Gegensatz zu rein osmotischen Volumenänderungen stehen, die auch im Dunkeln ablaufen:

- 1) eine lichtinduzierte Volumenzunahme (Swelling)
- 2) eine lichtinduzierte Volumenabnahme (Shrinkage).

Beide Möglichkeiten treten bei isolierten Chloroplasten und Chloroplastenpartikeln (NEUMANN & JAGENDORF, 1964; GROSS & PACKER, 1965) auf, abhängig von der Art des Suspensionsmediums und den zugesetzten Ionen (IZAWA & GOOD, 1966; PACKER et al., 1966). Dabei ist die lichtinduzierte Volumenzunahme, die in Gegenwart stark dissoziierter Ionen auftritt, langsamer, aber stärker in der Reaktion als die lichtinduzierte Volumenabnahme. Im Gegensatz zur Volumenabnahme ist sie aber bei Belichtungsende nicht völlig reversibel (PACKER et al., 1965) und kann auch durch

reine pH-Änderungen verursacht werden (DILLEY, 1966; PACKER et al., 1966).

Chloroplasten höherer Pflanzen (NOBEL, 1967; HEBER, 1969; KRAUSE, 1973) und von Grünalgen (GIMMLER, 1973; SCHÄFER & SENGER, 1974) in vivo zeigen normalerweise bei Belichtung eine Volumenabnahme; bei Anacystis wurde dagegen eine lichtinduzierte Volumenzunahme beobachtet (MOHANTY & GOVINDJEE, 1973).

1.4.1. Ursachen der Konformationsänderungen

Nach PACKER et al. (1968, 1969) beruht die lichtinduzierte Volumenzunahme bei isolierten Chloroplasten in Gegenwart stark dissoziierter Ionen auf einer Protoneneinwanderung in die Thylakoidinnenräume (DILLEY & VERNON, 1965), wodurch der interne pH-Wert absinkt. Gleichzeitig werden passiv Cl^- -Ionen aufgenommen, was einen Anstieg des osmotischen Wertes in den Chloroplasten, Wassereintritt und somit die Volumenzunahme hervorruft.

Dagegen führt die Zugabe von Anionen schwacher Säuren zu einer Schrumpfung der Chloroplasten, da die bei der Belichtung aufgenommenen Protonen das Gleichgewicht der dissoziierten schwachen Säuren in Chloroplasten zugunsten der undissoziierten Säure verschiebt. Diese kann auf Grund des Konzentrationsgefälles frei nach außen wandern. Der osmotische Wert in den Thylakoidräumen sinkt, und durch den darauf folgenden Wasserverlust nimmt das Chloroplastenvolumen ab (PACKER et al., 1967). Durch diese Überlegungen und mit Hilfe elektronenmikroskopischer Bilder kamen MURAKAMI & PACKER (1970) zu folgender Hypothese der eigentlich bei Belichtung ablaufenden Vorgänge, die sich in drei Schritte untergliedern lassen :

- 1) Die Konformationsänderungen im engeren Sinne.
Bei Belichtung werden Protonen in die Chloroplasten und die Thylakoidinnenräume aufgenommen. Sie entladen teilweise die Membranen, die durch die sich ändernde Hydratation schrumpfen.
Die Volumenabnahmen der Thylakoidmembranen können auch durch reine pH-Änderungen bewirkt werden. (DILLEY, 1966, 1967).
- 2) Die Konfigurationsänderungen. In Chloroplasten liegen im allgemeinen Anionen schwacher Säuren vor; diese reagieren auf die pH-Verschiebungen wie oben beschrieben. Durch Diffusion des Wassers werden die Thylakoidinnenräume schmaler und die Thylakoidstapel rücken näher aneinander.
- 3) Die Volumenabnahme des gesamten Chloroplasten.

Auch HEBER & KRAUSE (1971) erklären die reversiblen lichtinduzierten Volumenabnahmen von Chloroplasten mit einem ähnlichen Modell.

Es konnten eine Reihe von lichtinduzierten Ionen-transportphänomenen an den Thylakoidmembranen beobachtet werden : Ausfluß von K^+ , Mg^{++} (DILLEY & VERNON, 1965; PACKER & CROFTS, 1967) und Aufnahme von Cl^- -Ionen (PACKER & SIEGENTHALER, 1965; DEAMER et al., 1967; NOBEL, 1969), sowie Ausfluß undissoziierter Säuren (HELDT & RAPLEY, 1970; HEBER, 1974).

Durch den Ionen- und Säureaustritt wird Wasser (teils als Hydrathülle gebunden, teils auf Grund des osmotischen Potentials) nach außen transportiert, die Membranen schrumpfen, lagern sich zusammen, und das Chloroplastenvolumen nimmt ab. Die Aktivierung der Protonenpumpe des Thylakoidsystems ist also der primäre Effekt der

Belichtung mit photosynthetisch aktivem Licht und führt zur Protonierung der Thylakoidmembranen und damit zu den Konformationsänderungen. Als sekundärer Effekt folgen Ionenwanderungen und osmotisch bedingte Änderungen des Wassergehaltes, die schließlich zu einer Volumenänderung des ganzen Chloroplasten führen.

Auch die Folgereaktionen werden manchmal als Konformationsänderungen bezeichnet, da dieser Effekt dem Phänomen zugrunde liegt.

1.4.2. Methoden zur Messung der Konformationsänderungen

Die Messungen des lichtabhängigen Chloroplastenvolumens und Strukturänderungen der Chloroplasten in vivo und in vitro können auf verschiedene Weise erfolgen. Eine Zusammenfassung der Methoden und Ergebnisse ist bei PACKER & MURAKAMI (1972) zu finden.

Im wesentlichen lassen sich 4 Methoden unterscheiden :

- 1) gravimetrische Bestimmungen (Bestimmung des dichtest gepackten Volumens (PACKER et al., 1965; NOBEL, 1968, 1969; ZURZYCKI, 1974),
- 2) elektronenmikroskopische Methoden (HILGENHEGER & MENKE, 1965; MURAKAMI & PACKER, 1970),
- 3) photometrische Bestimmungen (Transmission oder Lichtstreuung) (HIND & JAGENDORF, 1965; DEAMER et al., 1967; HEBER, 1969; KRAUSE, 1973),
- 4) direkte Größenmessungen mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählers (Coulter Counter) (PACKER et al., 1966; NOBEL, 1967).

Diese Methoden werden teilweise auch bei den Volumenbestimmungen in lebenden Zellen herangezogen. Dafür haben sich vor allem die Streulicht- und Transmissions-

änderungen als geeignet erwiesen (HEBER, 1969; MURAKAMI & PACKER, 1970; GIMMLER, 1973). Algenthalli oder Blattstücke werden in Flüssigkeiten eingelegt oder in feuchte Kammern gebracht und mit den entsprechenden Salz- oder Hemmstofflösungen infiltriert, oder es werden Zellsuspensionen einzelliger Algen benutzt. Die Proben werden mit photosynthetisch aktivem Licht bestrahlt, während die Extinktions- oder Transmissionsänderungen zwischen 530 und 550 nm, in einem Bereich also, in dem die echten lichtabhängigen Absorptionsänderungen weniger ins Gewicht fallen, gemessen werden.

Wie schon erwähnt, zeigen Chloroplasten in vivo im wesentlichen lichtinduzierte Volumenabnahmen, da in vivo in den Chloroplasten Anionen schwacher Säuren überwiegen, die ja das Hauptprodukt der CO_2 -Fixierung sind (HELDT & RAPLEY, 1970; HEBER, 1974). Wie stark diese Änderungen sind, hängt von der Intensität und Wellenlänge des Anregungslichtes, der Art der Begasung und der Gegenwart von Elektronenakzeptoren oder Hemmstoffen ab.

1.4.3. Beziehungen zwischen Konformationsänderungen und den Photophosphorylierungen

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Volumenabnahme bei Belichtung dann eintritt, wenn die Bedingungen den Ablauf des photosynthetischen Elektronentransportes begünstigen (SHAVIT & AVRON, 1967).

HEBER (1969) stellte fest, daß es einen engen Zusammenhang zwischen dem Energiezustand des Thylakoidsystems, dem Phosphorylierungspotential ($\text{ATP/ADP} + \text{P}_i$) und der Chloroplastenschrumpfung bei Belichtung gibt. Auch für isolierte Chloroplasten gilt, daß sie ein Anschwellen nur dann zeigen, wenn sie in einem Medium suspendiert sind, das keine phosphorylierenden Be-

dingungen hat (PACKER, 1963; NISHIDA et al., 1966; NOBEL, 1967), während für die lichtinduzierte Schrumpfung auch in vivo ein enger Zusammenhang mit der PP beobachtet werden kann (HIND & JAGENDORF, 1965; TAMAI, 1970).

GIMMLER (1973) stellte einen direkten Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt der Zellen und der lichtabhängigen Volumenabnahme bei der Grünalge Dunaliella fest.

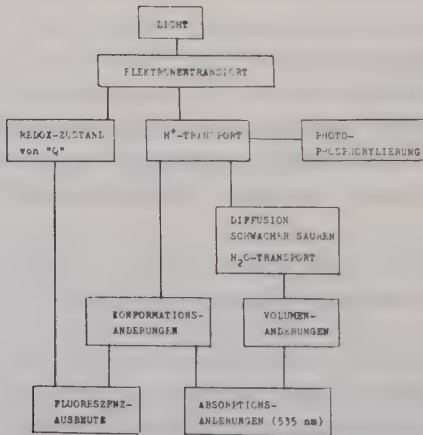


Abb. 3 : Beziehungen zwischen Chlorophyll a-Fluoreszenz, apparenter Absorption und Energiezustand des Thylakoidsystems. (aus KRAUSE, 1973)

KRAUSE (1973a, b) beobachtete mit Hilfe eines Vergleiches zwischen Chlorophyll-Fluoreszenz und der

Chloroplastenschrumpfung bei höheren Pflanzen einen Zusammenhang mit dem Energiezustand der Zelle (s. Abb. 3): Volumenabnahme und PP konkurrieren um die bei Belichtung einströmenden Protonen; ist wenig ADP vorhanden, die Phosphorylierung dadurch begrenzt, so stehen den Thylakoidmembranen viele Protonen zu Konformationsänderungen zur Verfügung, und die Chloroplasten schrumpfen optimal. Demnach zeigt eine starke Schrumpfung der Chloroplasten ein hohes Phosphorylierungspotential in den Chloroplasten an (HEBER, 1969, 1973).

Bei einem niedrigen Phosphorylierungspotential wird der pH-Gradient im wesentlichen von der Phosphorylierung des ADP abgebaut (MITCHELL, 1966). HEBER (1969) maß bei Begasung von Blättern mit N_2 und Belichtung mit langwelligem Licht eine starke Schrumpfung der Chloroplasten, also ein hohes Phosphorylierungspotential, das nur durch die zyklische PP hervorgerufen worden sein konnte. Sauerstoff brachte das Phosphorylierungspotential zum Zusammenbruch. Wurde mit kurzwelligem Licht bestrahlt, waren die Ergebnisse gerade umgekehrt, da nun eine nicht-zyklische, bzw. eine pseudo-zyklische PP ablaufen konnte, wenn Sauerstoff gegeben wurde.

Durch Entkopplerzugabe sinkt das Phosphorylierungspotential, und die Volumenabnahme wird geringer (KRAUSE & HEBER, 1971).

Eine Ausnahme bei den Befunden in vivo bilden die Untersuchungen von MOHANTY & GOVINDJEE (1973) an der Blaualge Anacystis, die bei Belichtung eine Volumenzunahme zeigt. Aus dem Anschwellen wurde auf eine Trennung der Membranstrukturen geschlossen, wodurch die Energieübertragung zwischen den Pigmentsystemen beeinflusst wird. Eine Volumenzunahme muß aber nicht unbedingt einer Zunahme der Membrandicke, der eigentlichen Konformationsänderung, entsprechen; sie kann möglicherweise auch nur sekundäre Effekte widerspiegeln.

1.5. Protonenaufnahme bei Belichtung

Lichtinduzierte pH-Änderungen in Chloroplasten höherer Pflanzen und Algen finden zunehmend Interesse, da man sie als treibende Kraft der Energiekonservierung (chemiosmotische Theorie) und als Ursache für strukturelle Änderungen in den Chloroplasten ansieht.

Man kann Protonenaufnahmen in isolierte Chloroplasten und Chloroplastenfragmente bei Belichtung nachweisen (JAGENDORF & NEUMANN, 1965; PACKER & CROFTS, 1967) die Protonen werden in die Thylakoidinnenräume transportiert.

Gleiche Ergebnisse erbrachten auch Untersuchungen an ganzen Zellen von *Dunaliella* (BEN-AMOTZ & GINZBURG, 1969).

Über das an der Protonenpumpe beteiligte Pigmentsystem bestehen noch Unklarheiten. Während Trebst (1974) und SCHLIEPHAKE et al. (1968) bei isolierten Spinatchloroplasten und LOOS (1974) bei isolierten Chloroplasten der Alge Bumilleriopsis einen Anteil beider Photosysteme annehmen, finden DILLEY & VERNON (1967) nur eine Beteiligung von PS I.

Die Kinetiken der Protonenaufnahme (HELDT & WERDAN, 1973) und der Konformationsänderungen ähneln sich in ihrem zeitlichen Verlauf sehr (PACKER & CROFTS, 1967). Beide sind bei Belichtungsende voll reversibel. Zugabe von Entkopplern, die die Protonendurchlässigkeit der Membranen so ändern, daß keine Gradienten mehr aufgebaut werden, hemmen beide Reaktionen.

Protonenaufnahmen in belichtete Chloroplasten können direkt in der Suspension gemessen werden (LOOS, 1974); HELDT & WERDAN (1973) bestimmen gleichzeitig pH-Änderungen im Thylakoidinnenraum und im Stroma mit Hilfe der Konzentrationsverhältnisse radioaktiv markierter, dissoziabler Substanzen, von denen nur die ungeladenen

Formen die Membranen passieren können.

HAGER (1969) benutzte die lichtabhängige Zeaxanthin-Bildung aus Violaxanthin als Indikator für eine lichtbedingte pH-Erniedrigung in den Chloroplastenkompartimenten und damit für die PP, da die Violaxanthinumwandlung das Ergebnis einer lichtabhängigen Enzymaktivierung durch die pH-Verschiebung ist.

(Weitere Literatur siehe ZIMMERMANN & DAINTY, 1974).

1.6. Synchronkulturen einzelliger Grünalgen

Synchronkulturen einzelliger Photosyntheseorganismen werden heute immer mehr in der Pflanzenphysiologie verwendet. Sie haben den Vorteil, daß die Proben aus einer synchronen Kultur immer dem jeweiligen Entwicklungszustand der Einzelzelle entsprechen; daher können die physiologischen Charakteristika einer Zelle für jeden Zeitpunkt ihrer Entwicklung bestimmt werden (SENGER, 1970a, b).

Mit Hilfe rhythmischer Licht-Dunkel-Wechsel oder durch Temperaturschocks können Algensuspensionen synchronisiert werden (LORENZEN, 1970; BISHOP & SENGER, 1971); die Untersuchungsergebnisse sind stark von der Synchronisationsschärfe abhängig. Die Kennzeichen einer vollsynchronen Kultur sind von SENGER & BISHOP (1969) zusammengefaßt worden.

Gesamtphotosynthesekapazität, Aktivität von PS II und der Quantenbedarf einer Zelle ändern sich während ihres Entwicklungszyklus.

Im allgemeinen steigt die Photosynthesekapazität bis zur Mitte der Lichtzeit und sinkt dann wieder bis kurz vor der Autosporenfreisetzung ab (SOROKIN & KRAUSS, 1961; SENGER, 1970; GIMMLER et al., 1971; WERTHMÜLLER et al., 1974).

Der Quantenbedarf liegt für Scenedesmus obliquus zur 8. Stunde, dem Zeitpunkt des Photosynthesemaximums, bei dem theoretisch zu erwartenden Wert 8 und steigt dann bis zur 16. Stunde, dem Zeitpunkt des Photosyntheseminimums bei Scenedesmus, auf 12 (SENGER, 1970, 1971).

Die Aktivität von PS I, gemessen als Photoreduktion von CO_2 mittels H_2 bleibt während des Entwicklungszyklus bei Scenedesmus konstant; die PS II-Aktivität dagegen, gemessen als Hillreaktion mit p-Benzochinon als Elektronenakzeptor an ganzen Zellen, zeigt ähnliche Schwankungen wie die Gesamtphotosynthesekapazität (SENGER, 1970).

Die Schwankungen der Photosyntheseleistung werden möglicherweise durch einen Engpass im photosynthetischen Elektronentransport hervorgerufen, der in der Reoxidationskapazität von Plastochinon liegt (SENGER & FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

Strukturelle Änderungen in dem Membransystem oder Poolveränderungen könnten die Veränderung im geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Elektronentransportes, der Reoxidation des Plastochinon, verursachen.

2. ZIELSETZUNG

Da Synchronkulturen von Scenedesmus und Chlorella in bezug auf ihre Wachstumsparameter und Schwankungen der Photosyntheseaktivität sehr gut untersucht sind (SENGER, 1975), ist es von Interesse, auch den Verlauf der PP während des Entwicklungszyklus aufzuklären.

Die schwankende Aktivität von PS II sollte die Rate der nicht-zyklischen ATP-Bildung bestimmen, während die PS I-Aktivität die treibende Kraft für die zyklische PP darstellt, die demnach in ihrer potentiellen Größe während der Zelldifferenzierung gleich bleiben sollte.

Dem widersprechen Befunde von SENGER (1970 b), der mit Hilfe anaerober Glukoseaufnahme im Licht in Gegenwart von DCMU zur 8. und 16. Stunde bei Scenedesmus ein inverses Verhalten der zyklischen PP zur Photosyntheseleistung feststellte.

GIMMLER et al. (1971) fanden bei Ankistrodesmus durch ^{32}P -Einlagerungsversuche eine gleichbleibende zyklische und eine parallel der Photosynthesekapazität schwankende nicht-zyklische PP.

Messungen der PP durch Bestimmung des ATP-Pools während des Synchronzyklus liegen für Chlorella- Kulturen vor; sie zeigen einen Anstieg während der Lichtzeit und eine Abnahme während der Dunkelzeit, vom Zeitpunkt der Zellteilung (SCHMID & NINNEMANN, 1972), beziehungsweise von der 14. Stunde, dem Beginn der Dunkelzeit (TISCHNER, 1974) an. Die Autoren schließen aus diesen ATP-Messungen nur auf eine allgemeine Änderung der Stoffwechselaktivität, da diese Pools, wie schon in Kap. 1.3. erwähnt, nur die Summe der ATP-Verbrauchs- und -Produktionsreaktionen anzeigen.

Es war daher sinnvoll, in der vorliegenden Untersuchung statt reiner Pool-Messungen in Synchronkulturen Δ ATP-Werte aus Dunkel-Licht-Wechseln zu bestimmen, wobei durch Variation der Bedingungen und durch Hemmstoff-

zugabe versucht werden sollte, einzelne ATP-produzierende Reaktionen gegeneinander abzugrenzen, deren Verlauf während der Zelldifferenzierung zu überprüfen und zu vergleichen, inwieweit sie mit den mit indirekten Methoden (Konformationsänderungen) erhaltenen Meßergebnissen übereinstimmen.

Außerdem sollte versucht werden, mit einer direkten und einer indirekten Methode die immer noch strittige Frage zu klären, ob eine zyklische PP in vivo unter aeroben Bedingungen abläuft, ob eine Umschaltung von zyklischer auf nicht-zyklische PP erfolgen kann, und wenn ja, wo der Umschaltort zwischen beiden in der Elektronentransportkette liegt.

3. METHODEN

3.1. Objekte und Anzucht

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im wesentlichen an der Grünalge Scenedesmus obliquus Stamm D3 (GAFFRON) durchgeführt, einige Versuche auch an Chlorella pyrenoidosa Stamm 211-8b (Algensammlung Göttingen), Chlamydomonas reinhardtii Stamm 11-32 (Algensammlung Göttingen) und der Mutante 6E von Scenedesmus obliquus (BISHOP, 1971).

Die Anzucht von Scenedesmus und Chlorella erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem anorganischen Nährmedium nach KESSLER et al. (1957), verändert nach BISHOP & SENGGER (1971), mit der Spurenelementlösung A₅ von KRATZ & MYERS (1955), die von Chlamydomonas in einer anorganischen Nährlösung nach KÜHL (1962). Die Scenedesmus-Mutante 6E wuchs im Dunkeln bei 30°C in einem Glukosehaltigen Nährmedium (SENGGER et al., 1975).

Die autotrophen Algensuspensionen befanden sich in Kulturröhren, die von unten mit einem Gasgemisch aus Luft + 3 % CO₂ durchperlt wurden. Die Kulturröhren standen in einem Lichtthermostaten (Kniese, Marburg) (KÜHL & LORENZEN, 1964) bei 28°C und wurden durch eine Kombination von je vier Leuchtstoffröhren des Typs Osram-L40W/15-1 (Tageslicht) und Osram-L40W/25-1 (Universal weiß) mit einer Lichtintensität von 15 000 - 22 000 Lux an der Kulturröhrenoberfläche belichtet.

Die Synchronisation erfolgt in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14 : 10 Stunden. Jeweils zu Beginn der Lichtzeit wurde mit einer automatischen, photometrisch kontrollierten Verdünnung die Suspension auf eine konstante Zellzahl ($3,1 \times 10^6$ Zellen/ml) eingestellt (PFAU et al., 1971; SENGGER et al., 1972).

3.2. Messungen des ATP-Gehaltes ganzer Zellen bei Dunkel-Licht-Wechseln

3.2.1. Versuchsanordnung

Algenproben wurden der Synchronkultur entnommen, 5 Minuten bei 1400 g in einer Tischzentrifuge (Christ Typ UJ 1) abzentrifugiert und so in frischer Nährlösung suspendiert, daß die Suspensionsdichte $10 \mu\text{l}$ PCV Algen/ml Nährlösung betrug.

Die Algensuspension wurde in eine durch einen Wassermantel temperierte (28°C) Glasküvette ("Lollipop") gefüllt, die etwa 20 ml faßt und mit Gas durchperlt werden kann. Diese Anordnung ermöglichte es, die Algen in Suspension zu halten und die Flüssigkeit aerob oder anaerob zu machen. Die Küvette wurde von beiden Seiten mit je einem Prado Universal (Leitz, Wetzlar) (Objektiv Colorplan 1:2,5/90mm) bestrahlt, in dessen Strahlengang sich in der Regel ein Cut-off-Filter $\lambda > 630 \text{ nm}$ (RG 630, Schott, Mainz) befand; die Lichtintensität an der Oberfläche der Küvette betrug $4,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$. Monochromatisches Licht wurde durch DAL-Filter (Schott, Mainz) der Wellenlängen $\lambda = 644, 682$ oder 716 nm erzeugt.

Die Suspension wurde jeweils 15 Minuten in völliger Dunkelheit belassen und gleichzeitig mit Gas durchperlt.

Aerobe Bedingungen : Preßluft
Anaerobe Bedingungen : $\text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$ oder
 N_2 durch eine Sauerstoffabsorptionspatrone (Oxisorb, Messer-Griesheim) von möglichen Sauerstoffresten befreit.

Während der Dunkelzeit wurden in 5-minütigem Abstand 1 ml-Proben mit einer 1 ml-Eppendorf-Pipette entnommen und sofort in 0,2 ml eiskalter 35%iger Perchlorsäure abgetötet. Der Zeitraum zwischen Probenentnahme und

Abtötung in der Perchlorsäure betrug im Höchstfall 5 Sekunden.

Während der darauf folgenden Belichtungszeit wurden in möglichst kurzen Zeitintervallen (5 - 10 sec) wieder jeweils 1 ml-Proben entnommen, abgetötet und mindestens 30 Minuten in der Kälte in der Perchlorsäure extrahiert.

In einer anderen Versuchsreihe wurden mit der Eppendorf-Pipette 1 ml-Proben direkt aus den Kulturröhrchen entnommen und ohne Vorbehandlung in Perchlorsäure abgetötet und extrahiert.

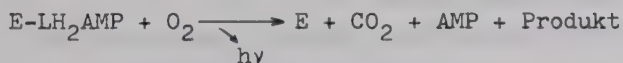
3.2.2. ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase-Methode

Die ATP-Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Methode (STREHLER, 1962), abgeändert nach WELSCH et al. (1969) und KAISER & URBACH (1972).

Prinzip :

Das Enzym Luciferase katalysiert in Gegenwart von Luciferin, Mg^{2+} -Ionen und ATP die Bildung von Adenyllumuciferin, das mit Luftsauerstoff zu Adenyloxiluciferin reagiert, wobei entsprechend der gebildeten Menge Adenyloxiluciferin Energie in Form von Licht frei wird. Das Adenyloxiluciferin ist unbeständig.

Der Reaktionsverlauf wurde von DENBURG et al. (1969) formuliert:



E = Luciferase

LH_2 = Luciferin

PP = Pyrophosphat

Mit hochgereinigten Luciferin-Luciferase-Extrakten wird bei dieser Reaktion nur ATP erfaßt.

Zugabe von Arsenat verlangsamt das Abklingen der Lumineszenz nach Vermischen der ATP- und Luciferase-Lösung erheblich (Abb. 4).

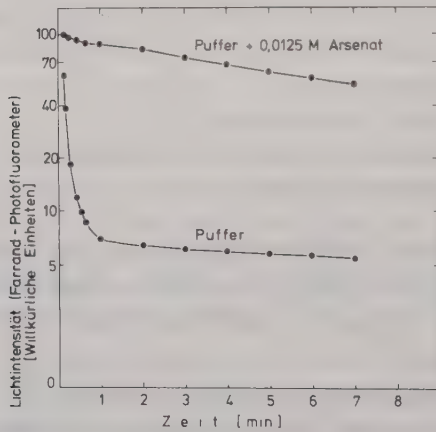


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Lumineszenz in Succinat-Puffer pH 7,4 und nach Zugabe von Arsenat. Aus STREHLER (1962).

Versuchsdurchführung:

Neutralisationslsg.: 22,5 ml gesättigte KOH
 17,5 ml 1 M KCl
 60,0 ml Trispuffer

Ansatz I: 0,5 ml Überstand
 4,0 ml Aqua bidest.
 0,5 ml 1 M Na_2HAsO_4

Ansatz II : 2,0 ml Tris-HCl-Puffer
 $2,5 \times 10^{-1}$ M, pH 7,4
 1,0 ml 1 M MgSO_4
 1,8 ml Aqua bidest.

Die Perchlorsäure-Extrakte wurden nach der Extraktionszeit durch ein Neutralisationsgemisch neutralisiert, 10 Minuten stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 5000 UPM in einer Christzentrifuge (Typ UJ 3) abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden zu 4 ml Wasser und 0,5 ml Arsenatlösung gegeben (Ansatz I).

Die Messung der Lumineszenz der Luciferin-Luciferase-Reaktion erfolgte in einem Szintillationszähler (Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3380). Kurz vor der Messung wurde Firefly-Lantern-Extract (Sigma Chem. Comp., FLE-50; gepufferter, löslicher Extrakt aus 50 mg getrocknetem Firefly-Abdomen) in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und 30 Minuten im Kühlschrank belassen, dann 3 Minuten bei 5000 UPM abzentrifugiert. Der Überstand enthält neben dem Luciferin-Luciferase-Gemisch 0,05 M Natriumarsenat und 0,02 M MgSO_4 , pH 7,4.

Unmittelbar vor der Messung wurde 0,5 ml Luciferin-Luciferase-System-Lösung zu Ansatz II gegeben, der sich in den Meßgefäßen des Szintillationszählers befand, dann sofort Ansatz I zu Ansatz II gegossen, gut geschüttelt, um eine gute Durchmischung, sowie hohe Sauerstoffsättigung zu erreichen und sofort im Szintillationszähler 4 mal je 0,1 Minuten gemessen.

Für jeden Enzymextrakt mußte eine Eichkurve mit bekannten Mengen ATP aufgenommen werden, da sie sich meist geringfügig in ihrer Aktivität unterscheiden. Die Eichkurven sind nicht in allen Bereichen linear. Aus ihnen kann mit den erhaltenen Impuls-Werten der Lumineszenz der ATP-Gehalt der Proben bestimmt werden.

Ansatz der Eichlösung: 0,5 ml 1 M Na_2HAsO_4 ,
 ATP-Eichlösung ($1 \gamma/\text{ml H}_2\text{O}$, jedes-
 mal frisch ansetzen), mit bi-
 destilliertem Wasser auf 5 ml auf-
 füllen.

3.3. Bestimmung lichtinduzierter Struktur- und Volumenänderungen mit Hilfe der Streulicht - technik

3.3.1. Meßmethodik

Lichtinduzierte Konformations- und Volumenänderungen
 einzelliger Grünalgen wurden mit Hilfe der Streu-
 lichttechnik in einem Aminco DW2-Spektralphotometer
 gemessen.

Algen wurden abzentrifugiert und in frischer Nähr-
 lösung oder Sörensenpuffer (0,05 M, pH 7,0) suspendiert.
 Die Suspensionsdichte betrug für Streulichtmessungen
 1,5 - 2,5 $\mu\text{l PCV/ml}$ Nährlösung, für Absorptionsmessungen
 7,5 - 10 $\mu\text{l PCV/ml}$.

Je drei Milliliter der Algensuspension wurden in zwei
 Allglasküvetten (1 cm) gefüllt und in dem Spektralphoto-
 meter so in den Probenraum gestellt, daß der Abstand
 Küvettenvorderseite-Photomultiplier bei Streulichtmessungen
 etwa 10 cm betrug; für Absorptionsmessungen wurden die
 Küvetten direkt vor den Photomultiplier gestellt (Abb. 5).

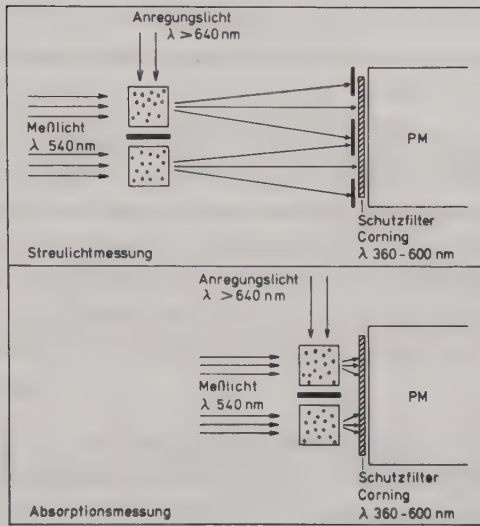


Abb. 5 : Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Streulicht- und Absorptionsmessung an Suspensionen ganzer Zellen.

Die Probenküvette konnte von der Seite mit Anregungslicht bestrahlt werden (Cross-Illumination). Als Anregungslichtquelle diente, wie bei den ATP-Bestimmungen, ein Prado Universal mit einem Rotfilter $\lambda > 630 \text{ nm}$ (RG 630, Schott, Mainz) und einem Wärmeschutzfilter (KG 1, Schott, Mainz) im Strahlengang.

Die Meßwellenlänge betrug 554 bzw. 540 nm; mit Hilfe einer optischen Schere waren eine simultane Anregung und Messung der Extinktionsänderung möglich: ein Interferenzlinienfilter (IL) $\lambda 554 \text{ nm}$, beziehungsweise ein Corning-Glass-Filter (Sovirel C.S.4.96)

λ 380 - 570 nm schützte den Photomultiplier vor dem Anregungslicht.

Es wurde in einem Bereich gemessen, in dem die echten lichtabhängigen Absorptionsänderungen kaum eine Rolle spielen.

Die bei Belichtung der Probe auftretenden Konformations- und Volumenänderungen in den Zellen änderten die Lichtstreuung, was als Änderung der Extinktion verfolgt werden konnte. Dies beruht darauf, daß kleinere Partikel eine größere Streuung aufweisen als große (Abb. 6).

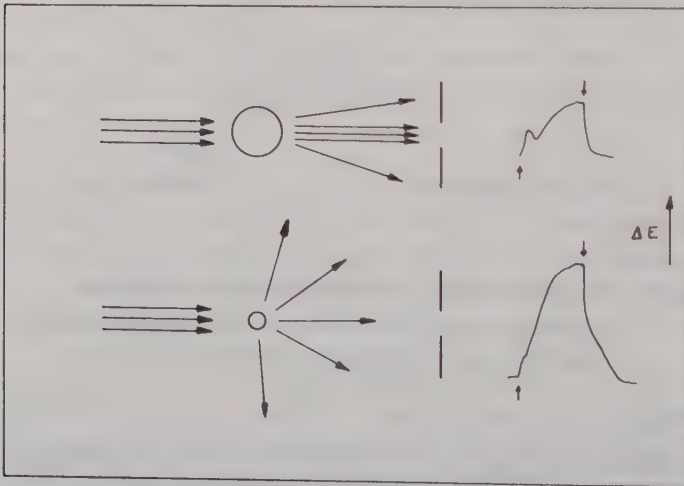


Abb. 6: Schematische Darstellung der Streuung an verschiedenen großen Partikeln, des Meßprinzips und der daraus resultierenden Extinktionsänderung.

Einer Verstärkung des Streulichtes, also eine Volumenabnahme äußert sich in einer Zunahme der Extinktion, da weniger Meßlicht auf dem Photomultiplier auftrifft

und so eine Absorptionszunahme vorgetäuscht wird. Bei der Absorptionsmessung spielt die veränderte Streuung der Probe bei Belichtung nur noch eine geringe Rolle (Abb. 5). Absorptionsmessungen wurden neben den Streulichtmessungen durchgeführt, um überprüfen zu können, ob auch echte Absorptionsänderungen an den Extinktionszunahmen bei Belichtung beteiligt sind.

Zur Absicherung der Meßmethode wurden Versuche mit isolierten Spinatchloroplasten durchgeführt, die, je nach Suspensionsmedium, bei Belichtung sowohl Volumen- zu- als auch -abnahmen zeigen, was auch mit anderen als spektroskopischen Methoden nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 1.4.2.).

Spinat wurde in einem Messer-Homogenisator jeweils eine Minute in Medium I oder II zerkleinert, das Homogenisat durch Mull filtriert, nachgewaschen und 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messungen verwendet.

Medium I : 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6,0
 20 μ M PMS
 100 mM Natriumacetat

Medium II : 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6,0
 20 μ M PMS
 100 mM NaCl

nach PACKER et al. (1966).

Medium I bewirkte bei den darin suspendierten Chloroplasten eine Volumenabnahme (Abb. 7) bei Belichtung, entsprechend einer Extinktionszunahme, Medium II eine Volumenzunahme, die sich entsprechend dem oben genannten Prinzip in einer Extinktionsabnahme äußert.

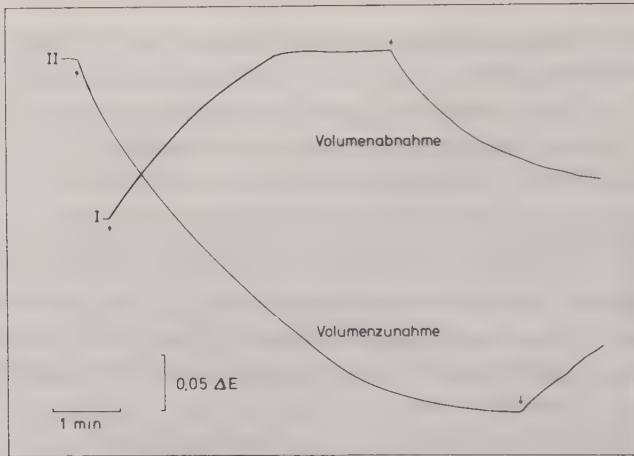


Abb. 7 : Streulichtänderungen isolierter Spinatchloroplasten bei Belichtung in Abhängigkeit von dem Suspensionsmedium.

Medium I enthielt Na-acetat (100 mM),
Medium II NaCl (100 mM). Anregungslicht
 $\lambda > 630 \text{ nm}$, $1,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$.

Meßwellenlänge : 554 nm; Schutzfilter : IL 554

Diese Messungen wurden in einem Shimadzu MPS 50-L-Zweistrahl-spektralphotometer durchgeführt, das ebenfalls mit einer Cross-Illumination ausgestattet war.

Streulichtmessungen an Chlorella pyrenoidosa, Chlamydomonas reinhardtii und der Scenedesmus-Mutante 6E wurden wie bei den Wildstammalgen von Scenedesmus im Aminco DW-2 Spektralphotometer vermessen. Bei Chlamydomonas konnten nur zur 16. Stunde Versuche gemacht werden, wenn die Mutterzellen unbegeißelt sind, da die begeißelten Autosporen bei Belichtung phototaktische Reaktionen zeigen, die die Extinktionsänderungen verfälschen. Um die Algen in Suspension zu halten, wurde die Algen-suspension zwischen den einzelnen Messungen immer

wieder aufgeschüttelt. Bei einigen sehr großen Zellen, wie zum Beispiel den Chlorella-Mutterzellen, die sich so rasch absetzten, daß keine Messungen durchgeführt werden konnten, bewährte sich eine Erhöhung der Nähr-lösungsdichte durch Glycerinzugabe (ungefähr 5 - 10 %).

Die Belichtungen dauerten etwa 1 - 2 Minuten; innerhalb dieser Zeit war die Volumenänderung normalerweise abgeschlossen.

Das Signal ist zweiphasig; da angenommen wurde, daß Phase 1 und 2 unterschiedlichen Ursprungs sind, wurden beide getrennt ausgemessen.

Die Belichtungsdauer wurde mit Hilfe eines elektronisch gesteuerten, photographischen Verschlusses (Compur Prontor electronic) bestimmt.

3.3.2. Anaerobe Bedingungen

Um Messungen unter anaeroben Bedingungen durchführen zu können, wurde die Zellsuspension in der Küvette nach Überschichten mit Paraffin mit $N_2 + 5\% CO_2$, beziehungsweise mit N_2 10 Minuten durchperlt und anschließend im Spektralphotometer belichtet. Dennoch konnte, vor allem bei hohen Lichtintensitäten, nur nach DCMU-Zugabe die Sauerstoffentwicklung völlig unterdrückt werden, wie Vergleichsmessungen der Sauerstoffentwicklung im Gilson-Oxygraph unter den entsprechenden Bedingungen zeigten.

Zur Messung der Volumenänderungen unter Photoreduktionsbedingungen wurden 15 μ l Scenedesmus-Zellen in 3 ml Sörensen-Puffer (0,05 M, pH 7,0) suspendiert und in Warburg-Gefäßen, deren Ansatzbirne 0,3 ml 1×10^{-5} M DCMU-Lösung enthielt, an einem Allglasdifferentialmanometer mit einem Gemisch aus 4 % CO_2 in H_2 begast.

Nach Schließen der Hähne blieben die Proben 12 Stunden unter der Wasserstoffatmosphäre, wobei sich eine Hydrogenase bilden konnte, die Wasserstoff spaltet (siehe SENGGER, 1970 b), der bei Belichtung als Elektronendonator für PS I dient. Da die Hydrogenase sauerstoffempfindlich ist, muß vor Belichtungsbeginn DCMU zu der Algensuspension gegeben werden.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Algen in die Küvetten gegossen, sofort mit Paraffin überschichtet, nochmals 10 Minuten mit H_2/CO_2 begast und dann im Spektralphotometer belichtet.

3.3.3. Zellfreie Systeme

Die Präparation photosynthetisch aktiver Partikel von Scenedesmus obliquus erfolgte nach BERZBORN & BISHOP (1973), modifiziert nach SENGGER & MELL (1975).

500 µl Algen wurden in Phosphatpuffer gewaschen, abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Phosphatpuffer aufgenommen und mit 51 ml Glasperlen (Ø 0,7 mm) in einer Vibrogen-Zellmühle (Bühler, Tübingen) 10 Minuten bei ca. +4° C geschüttelt. Die Suspension wurde dann mit einer Glasfritte (17 D1, Schott, Mainz) von den Glasperlen abgetrennt, mit Phosphatpuffer nachgewaschen und anschließend die vereinigten Filtrate zur Abtrennung ganzer Zellen von den Partikeln 15 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurden, wie oben für ganze Zellen beschrieben, die Versuche im Spektralphotometer durchgeführt.

3.3.4. Aktionsspektren

Zur Aufnahme von Aktionsspektren der Volumenänderungen wurde statt des Prado eine andere, stärkere Licht-

quelle verwendet (Schoeffel, Xenon-Hochdrucklampe). Zwischen Lichtquelle und Spektralphotometer wurde ein Monochromator (Schoeffel GM 250, Spalt 10 nm) gestellt, mit dem die Wellenlängen von 350 - 750 nm kontinuierlich eingestellt werden konnten. Mit Hilfe eines Linsensystems wurde der Lichtstrahl vom Monochromator aus gebündelt und in das Küvettengehäuse des Aminco DW-2 Spektralphotometers gelenkt. Wegen der Durchlässigkeit des verwendeten Schutzfilters (IL 554 nm) wurde das Aktionsspektrum nur bis $\lambda = 560$ nm aufgenommen. Die Lichtintensität des Anregungslichtes bei diesem Versuch betrug $2,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$.

3.4. Bestimmung der Volumenänderungen mit dem Coulter Counter

Um untersuchen zu können, ob sich die Volumenänderungen einzelliger Grünalgen auf die ganze Zelle erstrecken, wurden direkte Größenmessungen mit dem Coulter Counter (Coulter Electronics, Ltd., Engl., Counter Modell Z_BI, Channelizer, xy-Recorder) durchgeführt. Die Kapillarenöffnung hatte einen Durchmesser von 50 μm ; als Medium diente, wie bei den Streulichtmessungen, frische Scenedesmus-Nährlösung. Entsprechend der Leitfähigkeit der Nährlösung wurde die Einstellung gewählt: Matching Switch 50 k Ω , Gain Control 160, Operation Mode : locked. Die Eichung des Counters und Channelizers erfolgte mit Latexpartikeln bekannter Größe (Lot E9 : 13,56 μm ϕ , Lot D9 : 8,99 μm ϕ), die ebenfalls in Scenedesmus Nährlösung suspendiert waren.

Vor jeder Messung wurde die Nährlösung durch Membranfilter (Satorius, Porengröße 0,8 μm) filtriert, um das Grundrauschen zu erniedrigen und ein Verstopfen der Kapillare zu verhindern. Zahl und Größe der

Partikel in 0,5 ml Suspension wurden bestimmt. Dabei durfte die Zellzahl 320 000 Zellen / 0,5 ml nicht überschreiten, da sonst mehrere Zellen gleichzeitig die Kapillare passieren und nicht mehr getrennt registriert werden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und möglicher Fehlerquellen findet sich bei SHIBATA (1972).

Die Proben wurden in Bechergläser (25 ml) gefüllt und mit der gleichen Lichtquelle und Lichtintensität ($9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$) wie bei den Streulichtmessungen während des Durchlaufens der Probe durch die Kapillare belichtet. Vor jeder Belichtung wurden Messungen im völlig abgedunkelten Raum durchgeführt.

3.5. Versuchsbedingungen zur Abgrenzung der Phosphorylierungsarten gegeneinander

Um die einzelnen Phosphorylierungsreaktionen voneinander abgrenzen zu können, wurden Art der Begasung, der Belichtung und der zugegebenen Hemmstoffe variiert.

	ox.P	NPP	CPP
Luft	+	+	+ ¹⁾
N ₂ + 5% CO ₂	-	+	+
N ₂	-	-	+
DCMU ($1 \times 10^{-5}\text{M}$)	+	-	+
AA	+	+	-
NaN ₃	-	+ ²⁾	+ ²⁾
Belichtung mit Rotlicht			

1) siehe Kap. 1.1.1.

2) siehe Kap. 1.2.

Durch Kombination der Versuchsbedingungen konnten einzelne Phosphorylierungsarten weitgehend ausgeschlossen

werden. Eine mögliche pseudo-zyklische PP wurde nicht berücksichtigt, da sie durch diese Versuche nicht von der nicht-zyklischen PP abzutrennen ist.

Die verwendeten Hemmstoffe wurden entweder in Äthanol (DCMU, DBMIB, AA) oder in Wasser (NaN_3) gelöst. Die Alkoholkonzentrationen in den Proben nach Hemmstoffzugabe betrugen im Höchstfall 2,5 %. Bei den Streulichtmessungen wurden Blindproben (Alkohol ohne Hemmstoff) durchgeführt.

3.6. Bestimmung von Bezugsgrößen

Die Ergebnisse der Messungen wurden meist auf das dichtest gepackte Zellvolumen (PCV) pro ml Suspension oder auf den Chlorophyllgehalt bezogen. Der PCV-Wert wurde in Hämatokritröhrchen (nach Hamburger) nach 5 minütiger Zentrifugation bei höchster Tourenzahl in einer Tischzentrifuge bestimmt (SENGER, 1970 a).

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach mehrmaliger Extraktion mit heißem Methanol in einem PMQ II (Zeiss) Spektralphotometer durch Extinktionsmessung bei 650 und 665 nm gegen reines Methanol. Durch Berücksichtigung bestimmter Faktoren (SENGER, 1970 a) konnte auf mg Chl/l umgerechnet werden. Photosyntheseaktivität und Atmung wurden als Sauerstoffentwicklung beziehungsweise -verbrauch in einem Gilson Oxygraph (Gilson Medical Electronics) bestimmt (SENGER, 1970 a).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. ATP-Pool-Bestimmungen bei Scenedesmus

Messungen des ATP-Pools ganzer Zellen sind, wie schon erwähnt, deshalb so schwierig, weil nur ATP-Spiegel untersucht werden können, die das Ergebnis aller ATP-verbrauchenden und ATP-synthetisierenden Reaktionen darstellen und damit den Gesamtumsatz wiedergeben.

Die Wahl geeigneter Bedingungen ermöglicht es jedoch, einzelne Phosphorylierungsreaktionen auszuschließen.

4.1.1. Änderungen des ATP-Spiegels ganzer Zellen synchroner Scenedesmus-Kulturen bei Dunkel-Licht-Wechsel

4.1.1.1. Der Einfluß aerober und anaerober Bedingungen

Um ein Maß für die Größe des ATP-Pools im Dunkeln zu bekommen, dessen ATP-Produktion vor allem durch die oxidative P erfolgt, wurden die Zellen verdunkelt und ATP-Bestimmungen durchgeführt.

Die ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung (Δ ATP-Werte) können Aufschlüsse über die Photophosphorylierungsreaktionen geben.

Doch die Möglichkeit, durch sehr kurzfristige Belichtung die stets etwas langsamer anlaufenden ATP-verbrauchenden Reaktionen im Licht (vor allem die CO_2 -Assimilation) auszuschalten (BEDELL & GOVINDJEE, 1973), kam nicht in Betracht, da die kürzest mögliche Probenentnahmezeit nach Belichtungsbeginn 5 Sekunden betrug.

Begast man mit Luft, ergeben sich im Dunkeln relativ hohe ATP-Pools, die sich nach 5 - 8 Minuten auf einen konstanten Wert einstellen und auf eine stark ablau-

fende oxidative P schließen lassen (Abb. 8). Bei Belichtung sinkt der ATP-Pool - je nach Entwicklungsstadium der Zelle - mehr oder weniger rasch ab und erreicht nach 15 - 20 Sekunden einen Wert, der um rund 60 % zur 8. Stunde und um rund 20 % zur 16. Stunde unter dem des Dunkel-Pools liegt (negative Δ ATP-Werte !). Der Wert, der sich dann einstellt, ändert sich auch nach 2 minütiger Belichtung nicht mehr.

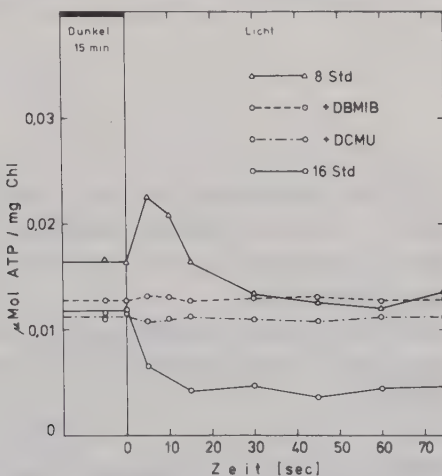


Abb. 8 : ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben Bedingungen (Preßluft) mit und ohne Hemmstoffzugabe. DCMU : 1×10^{-5} M, DBMIB 5×10^{-5} M; Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; Zellkonzentration : $10 \mu\text{l PCV/ml}$ Nährlösung.

Eine Begasung mit $\text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$ dagegen bewirkt bei Belichtung einen starken Anstieg des ATP-Pools um rund 80 % zur 8., beziehungsweise um 70 % zur 16. Stunde über den Dunkelwert (positiver Δ ATP-Wert, Abb. 9).

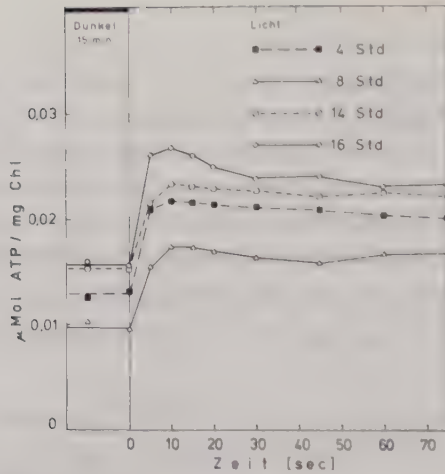


Abb. 9 : ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung zur 4., 8., 14. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter anaeroben Bedingungen ($N_2 + CO_2$).
 Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $4,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$; Zellkonzentration : $10 \mu\text{l PCV/ml}$ Nährlösung.

Nach einem schwachen Absinken pendelt sich auch hier ein gleichbleibender Wert ein.

Reine Stickstoffbegasung (Abb. 10) bewirkt einen sehr niedrigen Dunkelwert des ATP-Pools, weil die oxidative P gehemmt ist. Belichtet man mit Rotlicht, tritt auch hier eine ATP-Pool-Zunahme (rund 100% zur 8. Stunde und 70 % zur 20. Stunde) auf. Durch zusätzliche DCMU-zugabe wurde verhindert, daß doch noch eventuell Sauerstoff durch PS II entwickelt wird. Daher konnte auch nicht die 16. Stunde untersucht werden.

Das Absinken des ATP-Pools unter aeroben Bedingungen im Licht im Gegensatz zu den anaeroben Bedingungen läßt darauf schließen, daß bei Rotlicht-Bestrahlung in Anwesenheit von Sauerstoff sehr viel ATP verbraucht

wird; andererseits muß, vor allem zur 8. Stunde, viel ATP durch die nicht-zyklische PP produziert werden, da dies der Zeitpunkt optimaler Photosyntheseaktivität und niedrigsten Quantenbedarfs ist (SENGER, 1970a, b) und, wie aus Streulichtversuchen geschlossen werden kann (siehe Kap. 4.2.), das Phosphorylierungspotential im Chloroplasten das höchste des Entwicklungszyklus ist. Die ATP-verbrauchenden Reaktionen scheinen so stark zu sein, daß sie das entstehende ATP sofort verbrauchen und den Gesamt-ATP-Spiegel sogar absenken.

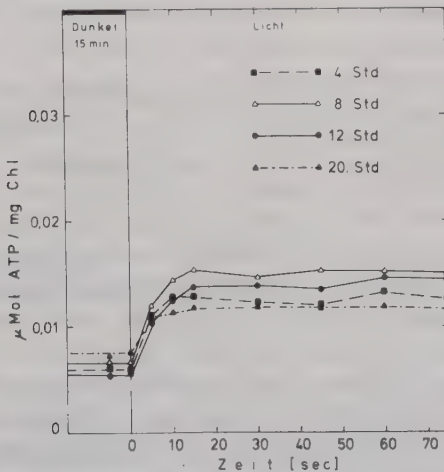


Abb. 10. : ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung zur 4., 8., 12. und 20. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter anaeroben Bedingungen (N_2) nach DCMU-Zugabe (1×10^{-5} M). Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; Zellkonzentration: 10 µl PCV/ml Nährlösung.

Zur 16. Stunde laufen die ATP-verbrauchenden Reaktionen entweder schwächer ab oder ihre Zahl ist geringer; kurz vor der Autosporenfreisetzung ist ja zum Beispiel die Proteinsynthese weitgehend abgeschlossen (WERTHMÜLLER, 1975).

Daher wird der ATP-Pool nicht ganz so stark gesenkt, und es kommt sogar zu einem kurzfristigen ATP-Pool-Anstieg, da ATP nicht ganz so schnell verbraucht wird wie zur 8. Stunde.

Das Absinken des ATP-Pools bei Belichtung unter aeroben Bedingungen ist schon von anderen Autoren beobachtet worden (URBACH & GIMMLER, 1970; JONES, 1970).

BEDELL & GOVINDJEE (1973) sehen darin ein Anzeichen dafür, daß, durch die Dunkelzeit bedingt, die Synthesereaktionen nicht in der Lage sind, die verbrauchenden Reaktionen auszugleichen. KANDLER et al. (1963) und LEWENSTEIN & BACHOFEN (1972) fanden einen positiven Verlauf der ATP-Pool-Veränderung bei Chlorella unter aeroben Bedingungen, ebenso GIMMLER (1973) bei Dunaliella und BEDELL & GOVINDJEE (1973) bei Synechococcus. Allerdings arbeiteten sie nicht mit definierten Kulturen, so daß es sich dabei auch um Alterungseffekte handeln könnte. Bei manchen höheren Pflanzen wie Zea mays fanden LÜTTGE et al. (1971) eine ATP-Spiegel-Abnahme, bei anderen eine Zunahme bei Belichtung.

Für den ATP-Pool scheinen relativ starke Regulationsmechanismen in den Zellen zu existieren. SANTARIUS et al. (1965), LEWENSTEIN & SCHNEIDER (1972) und PEDERSEN et al. (1966) fanden bei längerer Belichtung nach starken ATP-Pool-Änderungen eine Einregelung auf die ursprünglichen - die Dunkel - ATP-Pool-Werte. Die ATP-produzierenden und -verbrauchenden Reaktionen gleichen sich demnach mit der Zeit wieder aus.

Dies konnte in den vorliegenden Versuchen auf Grund der kurzen Belichtungszeiten nicht beobachtet werden. Im Gegenteil wurde Wert vor allem darauf gelegt, die ATP-Pool-Änderungen so kurz wie möglich nach Belichtungsbeginn zu bestimmen, um diese Regulationsreaktionen weitgehend ausschließen zu können, da sie die Rückschlüsse auf die PP verfälschen könnten.

Bei Anacystis muß es ebenfalls eine stark wirkende Regulation des ATP-Spiegels geben, die so schnell reagiert, daß auch Temperatur- und pH-Änderungen kaum einen Einfluß zeigen (BORNEFELD & SIMONIS, 1974). LEWENSTEIN & BACHOFEN (1972) beobachteten bei Licht-Dunkel-Wechseln bei Chlorella ein starkes Oszillieren des ATP-Wertes, was ebenfalls ein Hinweis auf ein komplexes Regulationssystem ist. BEDELL & GOVINDJEE (1973) konnten die negativen Δ ATP-Werte durch Oligomycin-Zugabe (Hemmstoff der oxidativen P) positiv werden lassen, da die Dunkel-Werte stark abgesenkt, die Licht-Werte aber nicht beeinflußt wurden.

Unter anaeroben Verhältnissen zeigt der ATP-Pool bei Belichtung immer eine starke Zunahme (FORTI et al., 1963; WELSCH & SMITH, 1969; URBACH & KAISER, 1972; BORNEFELD & SIMONIS, 1974).

Bei $N_2 + CO_2$ -Begasung könnte die Zahl der verbrauchenden Reaktionen niedriger sein als unter aeroben Bedingungen, aber die CO_2 -Fixierung, die ja besonders stark ATP verbraucht, läuft ab, da ja der nicht-zyklische Elektronentransport nicht gehemmt ist; im Gegenteil ist sogar bei der CO_2 -Fixierung unter diesen Bedingungen noch eine Steigerung zu verzeichnen (KRAUSE, 1973), beeinflußt von der CO_2 -Konzentration (JACKSON & VOLK, 1970) und der verstärkt ablaufenden Photosynthese. KRAUSE (1973) nimmt an, daß dieser Effekt mit der Hemmung der photosynthetischen Effektivität in normaler Luft zusammenhängt (siehe auch GIBBS et al., 1968; RAVEN, 1970). Die enthemmende Wirkung steigender CO_2 -Konzentrationen auf die Photosynthese wird oft damit erklärt, daß ein höherer Substratdurchsatz die Enzyme des Calvin-Zyklus stabilisiert (ZELITCH, 1971; ULLRICH, 1972). Eine zunehmende Photosyntheseaktivität verstärkt aber auch die nicht-zyklische PP, so daß trotz verstärktem ATP-Verbrauch der ATP-Spiegel zu-

nehmen kann.

Begast man mit reinem Stickstoff, kann nur noch eine zyklische PP ablaufen; der nicht-zyklische Elektronentransport ist gehemmt, weil keine CO_2 -Fixierung stattfinden kann (TANNER et al., 1965, 1969; JESCHKE & SIMONIS, 1969; URBACH & SIMONIS, 1967).

Wichtig bei dieser und der $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ -Begasung ist eine kontinuierliche Durchführung der Begasung, um den bei Belichtung zumindest bei $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ entstehenden Sauerstoff sofort wegzuspülen und die Sauerstoffkonzentration so niedrig wie möglich zu halten. Um aber eine Sauerstoffanwesenheit völlig ausschließen zu können, muß zusätzlich mit DCMU gehemmt werden. Geringe Sauerstoffspuren lassen noch eine pseudo-zyklische PP zu (HEBER, 1969).

4.1.1.2. Anteil der oxidativen Phosphorylierung

Unter anaeroben Bedingungen ist der Anteil der oxidativen P an der ATP-Produktion ausgeschlossen, spielt aber unter aeroben Verhältnissen eine große Rolle.

Fraglich ist, wie sich die oxidative P bei Belichtung verhält. Nach HOCH et al. (1963), RIED (1968) und ULLRICH (1970) wird in autotrophen Zellen die oxidative P durch Bestrahlung mit Rotlicht gehemmt. HEBER (1970) nimmt an, daß bei Belichtung eine Konkurrenzaktion zwischen PP und der oxidativen P um ADP auftritt; das in den Chloroplasten gebildete ATP schaltet durch Steigerung des Phosphorylierungspotentials im Cytoplasma die oxidative P aus. Das setzt voraus, daß ATP aus dem Chloroplasten in das Cytoplasma gelangen kann und eine strenge Kopplung zwischen den ATP-Spiegeln besteht, wie es ja schon von HELDT (1969) und HEBER (1970, 1974) nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt bewirkt ein Wegfall des Lichtes einen sofortigen

Anstieg der oxidativen P - die Regulation erfolgt wahrscheinlich über das gleiche System - , um den Wegfall der PP zu kompensieren (LEWENSTEIN & BACHOFEN, 1972). Auch GIMMLER et al. (1968) und URBACH et al. (1967) nehmen eine zumindest teilweise Hemmung der oxidativen P im Licht an. OKKEH et al. (1975) konnten bei Scenedesmus experimentell eine Regulation zwischen Glykolyse und PP nachweisen.

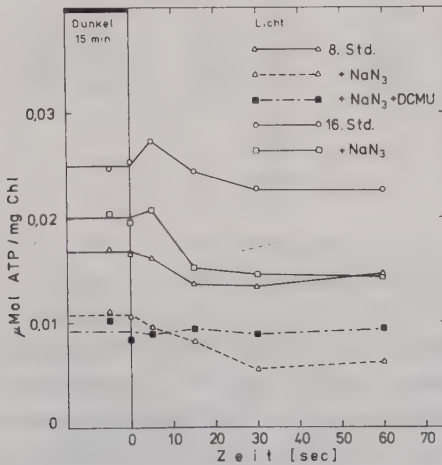


Abb. 11: ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben Bedingungen (Preßluft) mit und ohne Hemmstoffzugabe.
 NaN_3 : 5×10^{-4} M; DCMU : 1×10^{-5} M;
 Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm² sec;
 Zellkonzentration : 10 µl PCV/ml Nährlösung.

Um einen dennoch möglichen Anteil der oxidativen P an der ATP-Produktion im Licht auszuschließen, wurden NaN_3 und AA als Hemmstoffe zugegeben. Beide verursachen eine Herabsetzung des Dunkel-Pools um 37 (NaN_3)

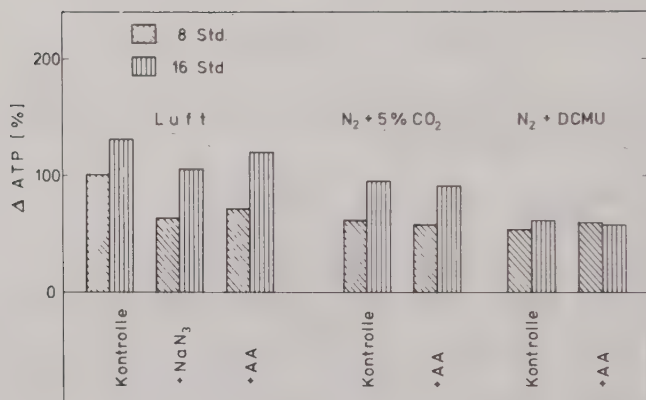


Abb. 12 : Prozentuale Änderung der ATP-Pool-Werte im Dunkeln zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben (Preßluft) und anaeroben (N₂ + CO₂ bzw. N₂) Bedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe.

NaN₃: 5×10^{-4} M; AA : 1×10^{-4} M;

Zellkonzentration : μ l PCV/ml Nährlösung

beziehungsweise 30 % (AA) zur 8. Stunde, um 20 beziehungsweise 10 % zur 16. Stunde. Dabei muß bei den letzteren Werten bedacht werden, daß zumindest AA aufgrund seiner Molekülgröße kaum in die Zelle eindringen kann, wie es ja schon für DCMU und DBMIB nachgewiesen wurde (siehe Kap. 1.2.) (Abb. 11 und 12).

Die Hemmung der oxidativen P setzt den ATP-Pool im Dunkeln nur herab; eine völlige Leerung konnte nie beobachtet werden.

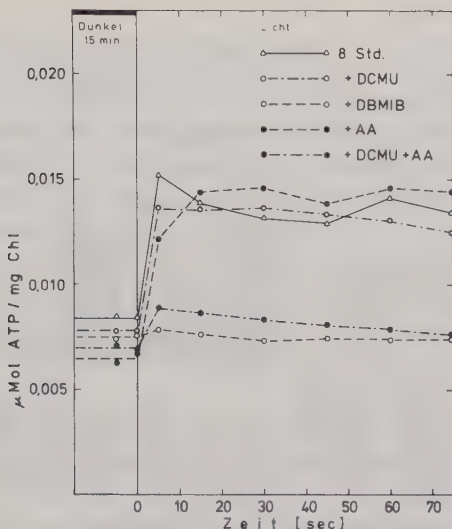


Abb. 13 : ATP-Pool-Änderungen bei Belichtung zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter anaeroben Bedingungen ($N_2 + CO_2$) mit und ohne Hemmstoffzugabe.

DCMU : $1 \times 10^{-5} M$; DBMIB : $5 \times 10^{-5} M$;

AA : $1 \times 10^{-4} M$.

Anregungslicht: $\lambda > 630 \text{ nm}$, $4,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$; Zellkonzentration : $10 \mu\text{l PCV/ml}$

Nährflüssigkeit.

Die Änderungen der ATP-Pool-Werte im Licht unter Einfluß der Hemmstoffe sind geringer als im Dunkeln, demnach scheint die oxidative P an der ATP-Produktion im Licht nur schwach beteiligt zu sein (Abb. 14). Andererseits muß berücksichtigt werden, daß beide Hemmstoffe im Licht auch die PP beeinflussen können, AA als Hemmstoff der zyklischen PP und NaN_3 als möglicher Entkoppler (siehe Kap. 1.2.). Die Änderungen der ATP-Pool-Höhe im Licht durch AA und NaN_3 brauchen demnach nicht unbedingt auf Änderungen der oxidativen P zu beruhen.

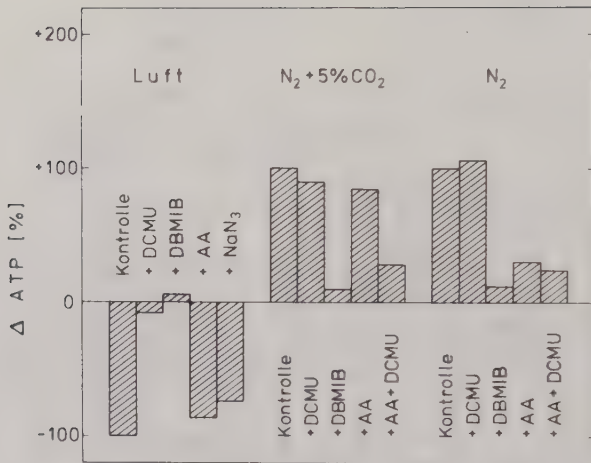


Abb. 14 : Prozentuale Änderung der Δ ATP-Werte zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben (Preßluft) und anaeroben (N₂ + CO₂ bzw. N₂) Bedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe.

DCMU : 1×10^{-5} M; DBMIB : 5×10^{-5} M; AA : 1×10^{-4} M; NaN₃ : 5×10^{-4} M.

Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; Zellkonzentration : 10 μ l PCV/ml Nährlösung.

Daß NaN₃ zur 8. Stunde im Dunkeln völlig die oxidative P hemmt, geht aus einem Vergleich der Pool-Werte unter aeroben und anaeroben Verhältnissen hervor (Abb. 12). Zur 16. Stunde liegen die anaerob erhaltenen Werte z.T. wesentlich unter denen nach NaN₃-Zugabe, was dafür spricht, daß zu diesem Zeitpunkt der Hemmstoff nicht voll wirksam werden konnte; noch stärker macht sich das

erwartungsgemäß für AA bemerkbar.

Auch BEDELL & GOVINDJEE (1973) finden unter anaeroben Verhältnissen und nach Hemmung der oxidativen P unter aeroben Bedingungen eine Senkung der Pool-Werte um rund 30 %. Bei einer $N_2 + CO_2$ -Begasung wäre eine schwache oxidative P denkbar, da ja in der Zelle Sauerstoff entsteht, der genutzt werden könnte. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein; AA-Zugabe ändert die Dunkelwerte nicht (Abb. 12).

4.1.1.3. Anteil der nicht-zyklischen und zyklischen Photophosphorylierung

Fraglich ist der Anteil der einzelnen PP an der ATP-Produktion im Licht.

Dieses Problem wurde mit Hilfe verschiedener Hemmstoffe untersucht. Wegen der schon mehrmals erwähnten Penetrationsschwierigkeiten zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus sollen im folgenden nur die Verhältnisse zur 8. Stunde betrachtet werden. DCMU-Zugabe in einer Konzentration, die nur die nicht-zyklische (und pseudo-zyklische) PP hemmt, beeinflußt in allen Fällen die oxidative P nicht (Abb. 8, 11, 13).

Unter aeroben Bedingungen ändert sich der ATP-Pool unter DCMU-Einwirkung nicht mehr (Abb. 8). Die Pool-Erniedrigung auf Grund des starken ATP-Verbrauches im Calvin-Zyklus fällt weg. Der ATP-Pool müßte dann bei Belichtung ansteigen. Dies ist aber nicht der Fall. Es kann daraus geschlossen werden, daß nach DCMU-Zugabe keine PP, also auch **keine zyklische PP** unter diesen Versuchsbedingungen abläuft.

Unter $N_2 + CO_2$ - und N_2 -Begasung beeinflußt DCMU-Zugabe die Δ ATP-Werte nicht. Die nach DCMU-Zugabe gemessenen Werte können sogar die normalen Δ ATP-Werte geringfügig übertreffen (Abb. 13, 14). Die wegfallende nicht-zyklische PP wird also sofort voll durch die

zyklische PP ersetzt.

DBMIB hemmt unter allen drei Bedingungen die Änderung des ATP-Pools bei Belichtung vollkommen (Abb. 8, 13, 14) und beeinflusst demnach auch die unter anaeroben Verhältnissen ablaufende zyklische PP. Auch URBACH & KAISER (1972) fanden unter N_2 -Begasung eine zyklische PP, die nicht DCMU-, wohl aber DBMIB-hemmbar war.

AA, Hemmstoff der zyklischen und oxidativen P, beeinflusst die ATP-Produktion in Gegenwart von Luft in der Weise, daß die Δ ATP-Werte weniger negativ werden (Abb. 14). Da keine zyklische PP abläuft, beruhen diese Änderungen wohl nur auf dem Einfluß von AA auf die oxidative P.

Unter $N_2 + CO_2$ -Bedingungen ändert AA die Δ ATP-Werte gar nicht, unter N_2 -Begasung werden sie stark erniedrigt (Abb. 14), d.h. die zyklische PP wird hier gehemmt, während sie unter $N_2 + CO_2$ rasch wieder durch eine nicht-zyklische PP ersetzt worden zu sein scheint.

Um dies zu erklären, wurden AA und DCMU gleichzeitig dazugegeben (Abb. 14). Durch die Hemmung der zyklischen und nicht-zyklischen PP sinkt die ATP-Produktion im Licht sehr stark ab, erniedrigt aber unter N_2 -Atmosphäre die ATP-Werte nur noch sehr geringfügig; es läuft demnach in den Stickstoff-begasten Zellen nur eine zyklische PP ab. In den mit $N_2 + CO_2$ begasten Zellen dagegen können beide Photophosphorylierungstypen auftreten; sie unterliegen einer sehr strengen, wirkungsvollen Regulation, durch die der Wegfall einer Photophosphorylierungsart sofort durch die andere kompensiert werden kann.

Ob beide PP gleichzeitig auftreten können oder nur getrennt, kann aus den vorliegenden Versuchen nicht geschlossen werden.

Der zyklische Elektronentransport muß zwischen der Hemmstelle des DCMU und des DBMIB in die Elektronentransportkette einmünden, da DBMIB die zyklische PP hemmt, DCMU nicht. Die Einmündungsstelle muß demnach das Plastochinon sein; DCMU greift nämlich vor, DBMIB hinter Plastochinon in die Elektronentransportkette ein (siehe Kap. 1.2.). Plastochinon als Einmündungsstelle des zyklischen Elektronentransportes wurde auch schon früher diskutiert (BÖHME & CRAMER, 1972; KAISER & URBACH, 1972; URBACH & SIMONIS, 1973; BIGGINS, 1974).

URBACH & SIMONIS (1967, 1970) vermuten eine Regulation zwischen zyklischer und nicht-zyklischer PP, HEBER (1969) und OKKEH et al. (1975) eine zwischen nicht-zyklischer, pseudo-zyklischer und zyklischer PP.

Möglicherweise ist das Plastochinon auch der Regulationsort für die Umschaltung auf zyklische oder nicht-zyklische PP. Daß es eine solche Stelle geben muß, zeigen die Ergebnisse.

Wie schon erwähnt, ist es wesentlich, unter anaeroben Bedingungen die Begasung ständig aufrecht zu erhalten. Dennoch sind, wenn nicht direkt mit DCMU gehemmt wird, Spuren von O_2 oder CO_2 in den Zellen nicht ausgeschlossen. Bei Versuchen in CO_2 -freien Medien kann normalerweise keine O_2 -Entwicklung gemessen werden; nach ULLRICH et al. (1969) und NOBEL (1967) läßt sich CO_2 in den Chloroplasten zum Teil durch andere Substrate des Intermediärstoffwechsels als Akzeptor für Reduktionsäquivalente benutzen. Es könnte demnach auch ohne CO_2 ein nicht-zyklischer Elektronentransport aufrecht erhalten werden.

Grünalgen können auch unter anaeroben Bedingungen unter völligem CO_2 -Mangel im Licht noch Sauerstoff in sehr geringen Mengen durch Nitrit- oder Nitrat-Reduktion (KESSLER, 1964; ULLRICH, 1971) freisetzen.

Diese Reaktionen sind allerdings bei niedrigen pH-Werten stark herabgesetzt und dürften unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben.

Warum Zugabe von AA die ATP-Änderungen in anaeroben Medien, in denen nur eine zyklische PP ablaufen kann, nicht völlig unterdrückte, kann nicht geklärt werden. Dieser Effekt wurde auch schon von anderen Autoren beobachtet (SIMONIS, 1966; RAVEN, 1970). Da auch DCMU-Zugabe keine zusätzliche Verminderung des ATP-Pools hervorruft, können weder eine nicht-zyklische, noch eine pseudo-zyklische PP an dem verbleibenden ATP-Pool beteiligt sein.

Über die Beteiligung der zyklischen PP an der ATP-Bildung unter anaeroben Bedingungen bestehen keine Zweifel. Unter aeroben Bedingungen läuft bei diesen Belichtungsversuchen keine zyklische PP bei Scenedesmus ab; dies ist auch nicht durch eine mögliche DCMU-Hemmung zu erklären, da die gleichen Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen die zyklische PP nicht hemmen.

GIMMLER et al. (1968) beobachteten bei ^{32}P -Einlagerungsversuchen unter $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ unterschiedliche Hemmung durch DCMU und DSPD und damit eine zyklische und eine nicht-zyklische PP, deren Raten aber nicht, wie in den hier vorliegenden Versuchen, gleich groß waren.

Da Hemmstoffversuche nur zur 8. Stunde durchgeführt werden konnten, und für die 16. Stunde des Entwicklungszyklus, dem Zeitpunkt geringster Photosyntheseaktivität, eine zusätzliche ATP-Lieferung aus der zyklischen PP gefordert wird (SENGER, 1970), wurden Versuche mit **m o n o c h r o m a t i s c h e m L i c h t** gemacht. Licht der Wellenlänge $\lambda > 700 \text{ nm}$ regt nur PS I an und damit die zyklische PP, Rotlicht $\lambda = 644 \text{ nm}$ bewirkt den nicht-zyklischen Elektronentransport.

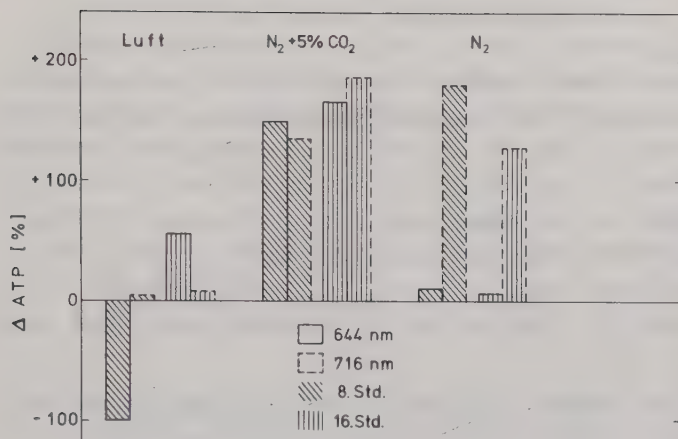


Abb. 15 : Prozentuale Änderung der Δ ATP-Werte zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes unter aeroben (Preßluft) und anaeroben ($N_2 + CO_2$ bzw. N_2) Bedingungen. Lichtintensität des Anregungslichtes : $1,4 \times 10^4$ erg / cm² sec.
DAL-Filter : $\lambda = 644$ nm, $\lambda = 716$ nm;
Zellkonzentration : 10 μ l PCV/ml Nährlösung.

Die Ergebnisse (Abb. 15) unterstützen voll die Befunde, die mit Hemmstoffen an Zellen der 8. Stunde gemacht wurden und bestätigen sie auch für die 16. Stunde des Entwicklungszyklus.

Unter aeroben Bedingungen ruft Licht der Wellenlänge 644 nm eine starke ATP-Pool-Änderung hervor, PS I-Licht

dagegen nicht (siehe auch URBACH & GIMMLER, 1970; GIMMLER, 1973).

Beide Wellenlängen bewirken dagegen unter $N_2 + CO_2$ -Begasung zur 8. und 16. Stunde starke Änderungen des ATP-Pools, entsprechend einer zyklischen und nicht-zyklischen PP; bei reiner N_2 -Begasung hat nur PS I-Licht zur 8. und 16. Stunde eine Wirkung.

Dies beweist, daß auch zur 16. Stunde unter aeroben Bedingungen keine, unter anaeroben Bedingungen eine zyklische PP abläuft, daß außerdem unter $N_2 + CO_2$ -Begasung sowohl eine zyklische, als auch eine nicht-zyklische PP ablaufen kann, die beide gleich groß sein können, wenn die eine PP ausfällt.

Auch für andere Organismen wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (URBACH & KAISER, 1972; GIMMLER, 1973).

BEDELL & GOVINDJEE (1973) nehmen eine zyklische PP in vivo unter aeroben Bedingungen bei Chlorella an, auch wenn die nicht-zyklische PP überwiegt, da sie nach DCMU-Hemmung noch ATP-Pool-Änderungen im Licht fanden. Allerdings wurden die Versuche mit nicht-definierten Kulturen durchgeführt; es könnte eine Rolle spielen, daß die Chlorella-Zellen nicht in allen Entwicklungsstadien gleich gut Hemmstoffe eindringen lassen (FRICKEL-FAULSTICH, 1974). Dadurch könnte durch die verminderte DCMU-Hemmbarkeit die Anwesenheit einer zyklischen PP vorgetäuscht werden.

Bei der Blaualge Anacystis tritt mit Sicherheit eine zyklische PP in vivo unter aeroben Bedingungen auf (BEDELL & GOVINDJEE, 1973; BORNEFELD & SIMONIS, 1974).

OKKEH et al. (1975) und KYLIN et al. (1967), die eine zyklische PP in vivo bei Scenedesmus annehmen, führten die Versuche alle unter Stickstoffatmosphäre durch.

4.1.2. Verhalten des ATP-Spiegels unbelichteter Proben während des Entwicklungszyklus unter verschiedenen Bedingungen

Die Änderungen der oxidativen P während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus sind aus Atmungsmessungen bekannt.

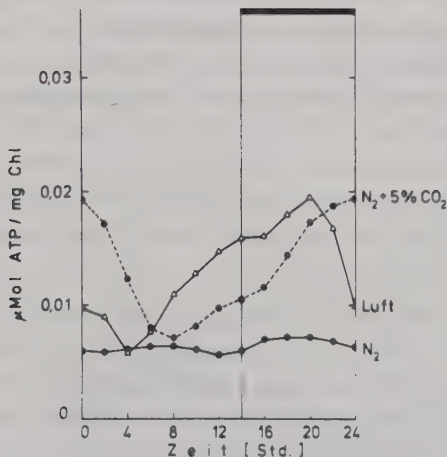


Abb. 16: ATP-Pool-Änderungen im Dunkeln während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben (Preßluft) und anaeroben (N₂ + CO₂ bzw. N₂) Bedingungen. Den Proben mit N₂-Begasung wurde DCMU (1×10^{-5} M) zugesetzt. Zellkonzentration : 10 µl PCV/ml Nährlösung.

Um feststellen zu können, inwieweit die Dunkel-ATP-Werte als Maß für die oxidative P genommen werden können und sich während des Entwicklungszyklus unter verschiedenen Bedingungen ändern, wurden die Pool-Werte

nach 15 Minuten Dunkelzeit während der Zelldifferenzierung bestimmt (Abb. 16). Unter aeroben Bedingungen steigt der ATP-Spiegel nach kurzem Absinken ziemlich gleichmäßig bis zur 20. Stunde an und sinkt dann rasch ab. Ein Vergleich mit der als Sauerstoffverbrauch gemessenen Atmung (Abb. 17) ergibt starke Differenzen. Die Atmung steigt von Beginn der Lichtzeit bis etwa zur 12. Stunde an und sinkt dann bis zur 24. Stunde ab. Die ATP-Pool-Werte spiegeln also nicht die oxidative P wider, da die ATP-verbrauchenden Reaktionen sich während der Zelldifferenzierung ändern und die Pool-Werte dadurch verschieden stark beeinflussen.

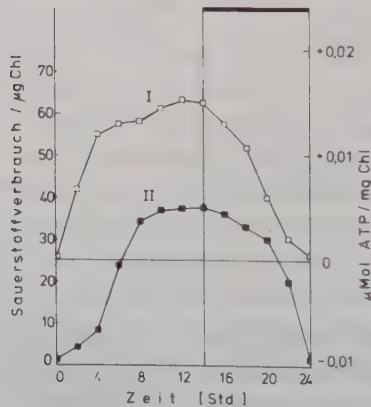


Abb. 17 : Atmung (I) und ATP-Pool-Differenzen (II) während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus. Die Atmung wurde als Sauerstoffverbrauch polarographisch in einem Gilson Oxygraph nach 15 Minuten Dunkelheit gemessen. Vor jeder Messung wurde die Probe mit Preßluft durchblasen. Die ATP-Pool-Differenzen wurden durch Subtraktion der ATP-Pool-Werte ($N_2 + CO_2$) von den ATP-Pool-Werten (Preßluft) erhalten. Zellkonzentration bei beiden Messungen: 10 µl PCV/ml Nährlösung.

Fällt die oxidative P weg, zum Beispiel unter anaeroben Bedingungen, ändert sich der Kurvenverlauf. Während unter Stickstoffeinfluß der ATP-Pool mehr oder weniger konstant bleibt, zeigt unter $N_2 + CO_2$ -Begasung die Kurve zur 8. Stunde ein Minimum und steigt dann bis zum Ende der Dunkelzeit wieder an. Diese Kurve müßte an sich allein die Stärke der ATP-verbrauchenden Reaktionen im Dunkeln widerspiegeln, da keine ATP-Produktion stattfindet (möglicherweise nur durch die Glykolyse). Ein ATP-Verbrauch durch die CO_2 -Fixierung scheidet aus, da sie ohne Licht nicht erfolgt. Andere Reaktionen scheinen bis zur 8. Stunde viel ATP zu verbrauchen; dann nimmt die Intensität oder Anzahl der verbrauchenden Reaktionen bis zum Ende der Zelldifferenzierung ab. In Anwesenheit von Stickstoff werden auch andere ATP-verbrauchende Reaktionen schwächer.

Unter der Voraussetzung, daß diese Vermutungen stimmen, wurden die Differenzen zwischen den ATP-Pools unter Preßluft- und $N_2 + CO_2$ -Begasung gebildet, um den Anteil der ATP-verbrauchenden Reaktionen an den Pool-Werten auszuschalten. Die sich daraus ergebende Kurve (Abb. 17) ist in ihrem Verlauf in bezug auf das breite Maximum zwischen der 8. und 14. Stunde der Sauerstoffverbrauchs-kurve vergleichbar. Zu- und Abnahme des ATP-Pools sind aber gegenüber der Atmungskurve verlangsamt.

4.1.3. Änderungen des ATP-Spiegels während des Entwicklungszyklus

Bestimmung des ATP-Gehaltes von Scenedesmus-Proben während des Synchronzyklus direkt aus den Kulturröhren ergab eine Abnahme des ATP-Spiegels während der Lichtzeit bis etwa zur 10. Stunde, dann eine Zunahme bis zur 16. Stunde, dem wieder eine allmähliche Abnahme bis zum Ende der Dunkelzeit folgte (Abb. 18).

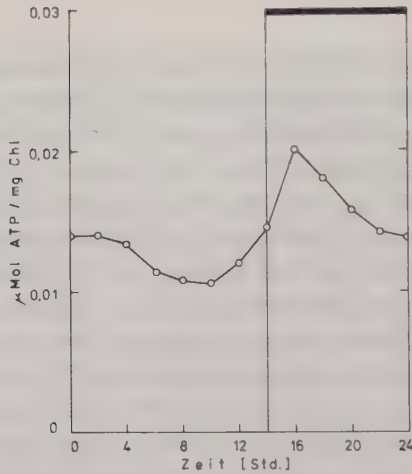


Abb. 18 : ATP-Pool-Änderungen während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus bei Probenentnahme direkt aus der Kulturröhre.

Begasung: Preßluft + 3% CO₂. Lichtintensität: 20 000 Lux während der Lichtzeit.

Unter diesen Versuchsbedingungen kann nicht zwischen dem Anteil der ATP-verbrauchenden und -synthetisierenden Reaktionen differenziert werden. Daher kann man diesen Kurvenverlauf nur als Maß für die Änderung der Stoffwechselaktivität der Zellen während ihrer Entwicklung ansehen; während der Lichtzeit, dem Zeitraum des Zellwachstums, wird zwar viel ATP durch die Phosphorylierungen gebildet, aber auch viel verbraucht, was auch die negativen Δ ATP-Werte der Kinetiken bei Dunkel-Licht-Wechsel zeigen. Kurz vor Zellteilungsbeginn sind die Synthesereaktionen (Zellwandproduktion, Proteinsynthese, Stärkebildung) weitgehend abgeschlossen, und der ATP-Verbrauch wird geringer. Das Ablösen der ATP-Produktion der PP durch die der oxidativen P macht sich nicht bemerkbar. Dies ist wieder ein Hinweis auf die gute Regulation zwischen beiden Phosphory-

lierungstypen.

SCHMIDT & NINNEMANN (1972) fanden bei Chlorella pyrenoidosa ebenfalls ein Maximum des ATP-Pools kurz vor Teilungsbeginn; der Anstieg erfolgte aber im wesentlichen zwischen der 14. und 18. Stunde, und die Abnahme zu Beginn des Zellzyklus fehlt. Eine Hemmung der oxidativen P durch Oligomycin beeinflusste nur die Pool-Höhe. Daraus schlossen sie, daß die ATP-Pool-Zunahme weniger ein Produkt der ATP-Synthese, als vielmehr Ausdruck der physiologischen Aktivität der Zellen sei.

TISCHNER (1974) dagegen beobachtete ebenfalls bei Chlorella einen stetigen Anstieg des ATP-Spiegels bis zu Beginn der Dunkelzeit und dann eine Abnahme durch den starken ATP-Verbrauch durch die Zellteilungsvorbereitungen.

4.1.4. Änderungen der Δ ATP-Werte während des Entwicklungszyklus

Die Δ ATP-Werte zeigen ebenfalls starke Schwankungen während der Zelldifferenzierung von Scenedesmus. Sie sinken unter aeroben Bedingungen bis zur 8. Stunde ab, steigen dann stark bis etwa zur 18. Stunde an und sinken dann wieder langsam ab. Die Δ ATP-Werte sind während der Dunkelzeit des Synchronzyklus nur nach 5 Sekunden Belichtung positiv (Abb. 19), bei längerer Belichtung negativ (Abb. 20). Sonst ähneln sich die Kurvenverläufe, nur zeigen die länger belichteten Proben eine Gesamtverschiebung um etwa 2 Stunden. Diese und die Kurve des ATP-Spiegels bei Probenentnahme direkt aus der Kulturröhre (Abb. 18) gleichen sich im Prinzip sehr und geben den Gesamtumsatz von ATP wieder, nur daß während der 14. bis 24. Stunde

hier die ATP-Produktion durch die Photophosphorylierungen erfolgt.

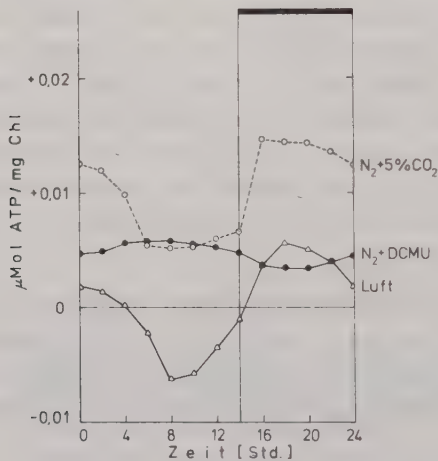


Abb. 19: Änderungen der Δ ATP-Werte während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben (Preßluft) und anaeroben (N₂ + CO₂ bzw. N₂) Bedingungen nach 5 Sekunden Belichtung. Den Proben mit N₂-Begasung wurde 1×10^{-5} M DCMU zugesetzt. Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm²sec; Zellkonzentration : 10 μ l PCV/ml Nährlösung.

Außer den schon bei den unbelichteten Proben erwähnten ATP-verbrauchenden Reaktionen kommt nun vor allem der ATP-Verbrauch durch die CO₂-Fixierung hinzu.

Das gleiche gilt für die Δ ATP-Werte unter N₂ + CO₂-Begasung. Ein möglicher Anteil der oxidativen P fällt hier zwar weg, dennoch können auch hier keine Aussagen über das Ausmaß der Beteiligung von zyklischer und nicht-zyklischer PP gemacht werden, da auch die verbrauchenden Reaktionen vorhanden sind.

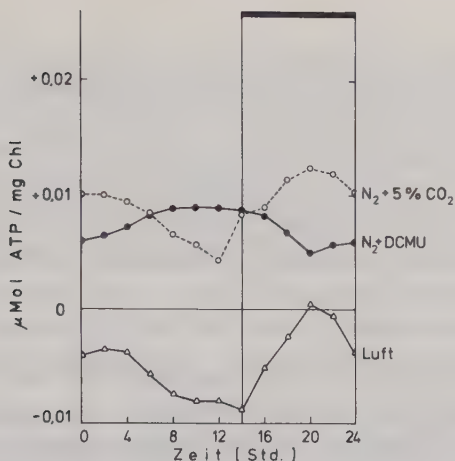


Abb. 20 : Änderungen der Δ ATP-Werte während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben (Preßluft) und anaeroben (N₂+CO₂ bzw. N₂) Bedingungen nach 60 Sekunden Belichtung. Den Proben mit N₂-Begasung wurde 1×10^{-5} M DCMU zugesetzt.
Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, $4,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; Zellkonzentration : 10 μ l PCV/ml Nährlösung.

Unter N₂-Begasung, wobei zusätzlich durch DCMU-Zugabe jegliche Sauerstoffentwicklung verhindert wurde, ist ein völlig anderer Kurvenverlauf zu beobachten. Die Δ ATP-Werte steigen während der Lichtzeit langsamer an, haben ein breites Maximum zwischen der 8. und 10. Stunde und sinken dann wieder bis zur 18. bis 20. Stunde ab. Unter diesen Bedingungen kann nur eine zyklische PP ablaufen; ein ATP-Verbrauch durch CO₂-Fixierung fällt weg, und auch sonst scheinen unter diesen Bedingungen so gut wie keine verbrauchenden Reaktionen abzulaufen, wie die Dunkel-Pool-Werte (Abb. 17) der Kinetiken zeigen.

Nach 60 Sekunden Belichtung sind die Maxima und Minima noch stärker ausgeprägt. Wenn man davon ausgeht, daß kein ATP-Verbrauch stattfindet, spiegelt diese Kurve den Verlauf der Änderungen der zyklischen PP während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus wider. Die zyklische PP hat demnach während der Lichtzeit um die 8. Stunde ein Maximum, sinkt dann um rund 50% ab und erreicht ein Minimum zur 18. - 20. Stunde in der Dunkelzeit.

Damit stehen diese Befunde im Gegensatz zu den Ergebnissen von SENGER (1970) und GIMMLER et al. (1969) (siehe Kap. 2.). Dabei muß aber erwähnt werden, daß die Versuche von SENGER nicht berücksichtigen, daß das zur Hemmung von PS II verwendete DCMU nicht zu allen Stunden gleich gut in die Zelle eindringen kann, wodurch eventuell die höheren Raten der lichtinduzierten Glukoseaufnahme zur 16. Stunde, die als erhöhte zyklische PP zu diesem Zeitpunkt gedeutet wurden, erklärbar sind.

GIMMLER et al. dagegen fanden eine mehr oder weniger gleichbleibende zyklische PP während des Zyklus von Ankistrodesmus.

Wenn man davon ausgeht, daß die zyklische PP in Plastochinon einmündet, hängt der zyklische Elektronentransport von der Reoxidierbarkeit des Plastochinons ab. Wie aber gezeigt werden konnte (SENGER & FRICKEL-FAULSTICH, 1974), stellt die Reoxidierbarkeit des Plastochinons während des Zellzyklus den Engpaß für den Elektronentransport dar. Zur 16. Stunde ist sie geringer als zur 8. Stunde, so daß weniger Elektronen hindurch können, was auch die Schwankungen der Photosynthesekapazität und der PS II - Aktivität während des Zyklus verursacht. Nimmt man aber an, daß die zyklische PP ebenfalls in Plastochinon einmündet, müßte auch sie die gleichen Schwankungen in ihrer Aktivität zeigen. Dann ist der Kurvenverlauf der zyklischen PP während des Entwicklungszyklus gut erklärbar.

Die bei Scenedesmus als Photoreduktion gemessene Photosystem I-Aktivität bleibt während des Entwicklungszyklus konstant, verläuft demnach nicht durch Plastochinon, sondern die Elektronen werden von dem künstlichen Elektronendonator wohl hinter dem Engpaß in die Elektronentransportkette eingefüttert.

4.2. Lichtabhängige Konformationsänderungen bei Scenedesmus, Chlorella und Chlamydomonas

Belichtung in frischer Nährlösung suspendierter Algenzellen führt zu Struktur- und Volumenänderungen des Chloroplasten in den Zellen, wodurch Streulichtänderungen hervorgerufen werden können, die an Hand von Extinktionsänderungen spektralphotometrisch verfolgt werden. Lichtinduzierte Volumenänderungen wurden zuerst bei isolierten Chloroplasten höherer Pflanzen beobachtet (PACKER & MURAKAMI, 1972), später auch an Chloroplasten höherer Pflanzen in vivo (NOBEL, 1968; HEBER, 1969; KRAUSE, 1973) und schließlich auch bei einzelligen Algen (GIMMLER, 1973; MOHANTY & GOVINDJEE, 1973). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Volumenänderungen in Abhängigkeit vom Zellalter bei Scenedesmus, Chlorella und Chlamydomonas unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen verhalten, um daraus Rückschlüsse auf die in den Zellen ablaufende PP zu ziehen.

4.2.1. Messung der Konformationsänderungen als Streulichtänderung

Abb. 21 zeigt für Scenedesmus-Zellen der 8. und 16. Stunde typische Signale, die bei Anregung mit photosynthetisch aktivem Licht bei Streulichtmessungen auftreten. Sofort nach Belichtungsbeginn erfolgt ein relativ schneller Anstieg der Extinktion, der nach 4 - 8

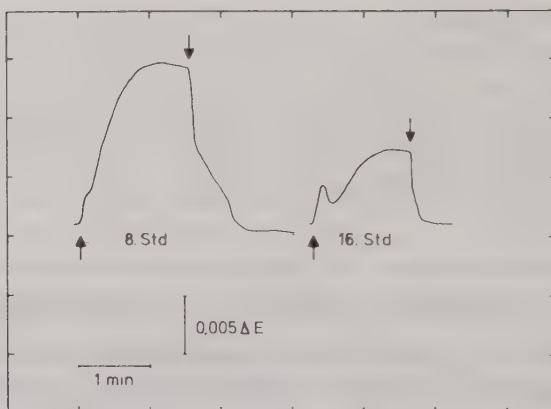


Abb. 21 : Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus.

Zellkonzentration : 1,5 μl PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$;
 Meßwellenlänge : 540 nm;
 Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

Sekunden ein Maximum erreicht (Phase 1). Daran kann sich sofort ein zweiter, langsamerer Anstieg anschließen (Phase 2), wie es zur 8. Stunde der Fall ist, oder der zweite Anstieg beginnt nach einer kurzen Verzögerungsphase, während der es zu einer Abnahme der Extinktion kommen kann. Nach 25 - 50 Sekunden erreicht die zweite Extinktionszunahme einen Sättigungswert, der dann bei Fortsetzung der Anregung ziemlich konstant bleibt.

Bei Belichtungsende ist das gesamte Signal voll reversibel. Auch hierbei folgt auf eine schnelle Extinktionsabnahme (Dauer 2 - 4 Sekunden) eine langsamere Phase. Der Extinktionsrückgang ist meist genauso schnell oder schneller als die Extinktionszunahme.

Wie in Kap. 1.4. und Kap. 3.3. schon dargestellt, entspricht eine Extinktionszunahme einer Volumenabnahme des Chloroplasten, wodurch eine stärkere Streuung hervorgerufen wird. Scenedesmus-Zellen verhalten sich damit wie die Chloroplasten höherer Pflanzen in vivo.

Ähnlich sehen die Signale bei anderen einzelligen Grünalgen aus (Chlorella pyrenoidosa, Chlamydomonas reinhardtii, Abb. 22).

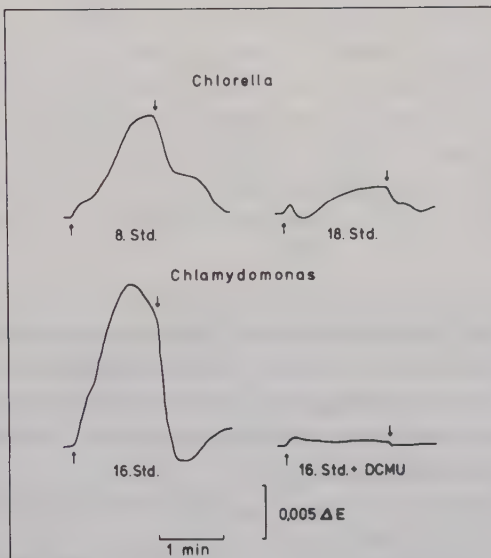


Abb. 22 : Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 18. Stunde von Chlorella und zur 8. und 16. Stunde von Chlamydomonas. DCMU-Zugabe bei Chlamydomonas: 5×10^{-6} M; Meßwellenlänge : 540 nm; Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm. Bei Chlorella : Meßwellenlänge : 554 nm; Schutzfilter λ : IL 554 nm. Zellkonzentration : 1,5 μ l PCV/ml Nährlösung; Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm; 9×10^4 erg/cm² sec.

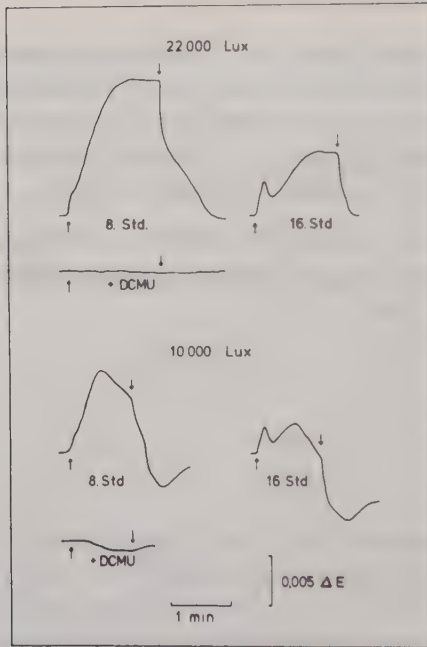


Abb. 23 : Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Intensität des Anzuchtlichtes der Kultur mit und ohne DCMU-Zugabe.
 DCMU : 1×10^{-5} M; Zellkonzentration: $1,5 \mu\text{l}$ PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$;
 Meßwellenlänge : 540 nm ;
 Schutzfilter : Corning $\lambda 380-570 \text{ nm}$.

Auch GIMMLER (1973) fand ähnliche Signale bei Belichtung der einzelligen Grünalge Dunaliella. Die Kurven unterscheiden sich nur in der Höhe und der Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei Belichtung.

Mit Chlamydomonas konnten nur zur 16. Stunde Belichtungsversuche gemacht werden, da die dann vorliegenden Autosporen-mutterzellen unbegeißelt sind und nicht phototak-

tisch reagieren können.

Die Intensität des Anzuchtlichtes der Kulturen spielt eine Rolle bei dem Verlauf der lichtinduzierten Extinktionsänderungen (Abb. 23). Niedrige Intensitäten bewirken bei den Algen in Phase 2 der Änderungen erneut eine Extinktionsabnahme. Dies scheint auf einer Reaktion zu beruhen, die die eigentlichen Streulichtänderungen auf Grund der Volumenabnahme überlagert, da die Kurven nach Belichtungsende noch unter den Ausgangswert absinken. Dies könnte ein Anschwellen des Chloroplasten über sein Ausgangsvolumen hinaus bedeuten; andererseits entsprechen diese zusätzlichen Extinktionsabnahmen in ihrem Betrag genau dem, um den sie schon während der Belichtung abgenommen hatten, und genau um diesen Betrag zeigen die Algen während der Dunkelzeit eine an die Extinktionsabnahme folgende Extinktionszunahme.

Was für eine Reaktion der Grund für diese Signalverschiebung ist, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine echte Absorptionsänderung, die in ihrer Richtung den Streulichtänderungen entgegengerichtet ist und nur in Schwachlichtkulturen auftritt. Das Ausmaß der Extinktionszunahmen ist bei diesen Kulturen geringer als in Starklicht-Kulturen.

Die vorliegenden Versuche wurden alle an Starklichtkulturen durchgeführt. Die Änderungen von Phase 2 sind erheblich kleiner als bei isolierten Chloroplasten (Abb. 7) oder Chloroplasten höherer Pflanzen in vivo (HEBER, 1969).

Die Zellen der verwendeten Grünalgen enthalten jeweils nur einen großen Chloroplasten.

Fraglich war, ob nur Chloroplastenstruktur- und volumenänderungen stattfinden, oder ob auch das gesamte Zellvolumen beeinflusst wird.

Untersuchungen mit dem Coulter Counter brachten aber keine Hinweise auf meßbare Volumenänderungen der ganzen Zelle bei Belichtung. Entweder sind die Gesamtvolumenänderungen der Zelle zu gering, um auf diese Weise gemessen werden zu können, oder, was wahrscheinlicher ist, die Streulichtänderungen beruhen nur auf Konformations- und Konfigurationsänderungen und der daran anschließenden Volumenabnahme des Chloroplasten.

Reine pH-Änderungen über oder unter den pH-Wert der Nährlösung (5,8) bewirkten ein deutliches Anschwellen der Zellen, das aber durch Belichtung nicht beeinflußt werden konnte. Ob dies mit ähnlichen Effekten bei isolierten Chloroplasten (DILLEY, 1966; PACKER et al., 1966) parallelisiert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

Ebenfalls nicht weiter verfolgt wurden Beobachtungen, daß nach etwa 15 minütiger intensiver Belichtung von Chlamydomonas mit Weißlicht diese ab einem gewissen Entwicklungsstadium verfrüht ihre Autosporen entlassen. Ein ähnliches Phänomen wurde von STRASSER et al. (1970) an Chlorella beobachtet, die daraus auf ein Anschwellen der Chloroplasten bei Belichtung schlossen, was zum Aufplatzen fast reifer Autosporenmutterzellen führte. Eine lichtinduzierte Volumenzunahme (und somit eine Extinktionsabnahme) des Chloroplasten bei Chlorella konnte aber durch Streulichtmessungen zu keinem Zeitpunkt des Entwicklungszyklus beobachtet werden.

4.2.2. Die schnelle Extinktionsänderung (Phase 1)

Die Streulichtänderungen der Grünalgen sind zweiphasig. Phase 1 ist zur 16. Stunde, Phase 2 zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus größer. Biphasigkeit konnte bis jetzt bei isolierten Chloroplasten noch kaum

beobachtet werden, wohl aber bei belichteten Chloroplasten in vivo. MURAKAMI & PACKER (1970) deuteten eine vor der eigentlichen Streulichtänderung auftretende schnellere Extinktionszunahme als Ausdruck eines sekundären osmotischen Effektes, während HEBER (1969) bei höheren Pflanzen, und GIMMLER (1973) bei Dunaliella Phase 1 als eine echte Absorptionsänderung (520 nm-Absorptionsänderung) ansahen.

4.2.2.1. Abhängigkeit von der Suspensionsdichte und Meßtechnik

Um zu untersuchen, ob der Phase 1 des Signals bei Scenedesmus obliquus ebenfalls eine echte Absorptionsänderung zugrunde liegt, wurden nacheinander Streulicht- und Absorptionsmessungen durchgeführt. Dabei ergab sich eine Abhängigkeit der Reaktion von

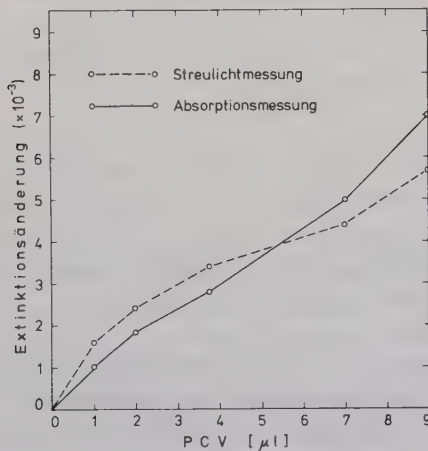


Abb. 24: Phase 1 zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte bei unterschiedlichen Meßtechniken. Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm²sec; Meßwellenlänge: 520 nm; Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm.

der Suspensionsdichte. In geringen Suspensionsdichten ($1,5 - 5 \mu\text{l PCV/ml}$) ist Phase 1 bei Streulichtmessungen, in höheren Zellkonzentrationen ($5 - 10 \mu\text{l PCV/ml}$) bei Absorptionsmessungen größer (Abb. 24). Dies und eine unterschiedliche Abhängigkeit der Phase 1 von der Wellenlänge des Meßlichtes in dünnen (Abb. 25) und dichten (Abb. 26) Kulturen weisen darauf hin, daß zwei verschiedene Reaktionen die Phase 1 beeinflussen und je nach Suspensionsdichte unterschiedlich stark zum Tragen kommen. In dichten Zellsuspensionen liegt der optimale Meßwellenlängenbereich zwischen 515 und 520 nm, in dünnen Zellsuspensionen bei 530 - 540 nm, unabhängig von der Meßtechnik.

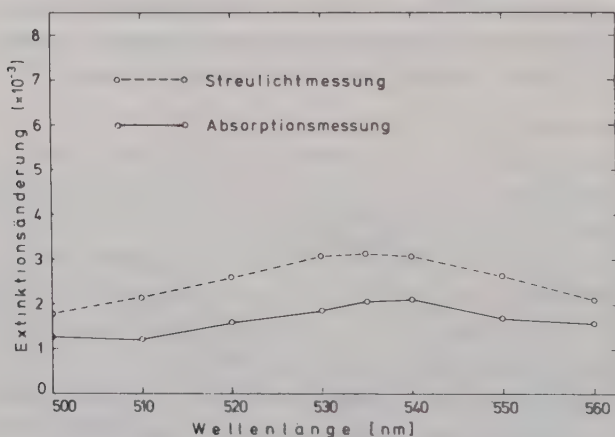


Abb. 25 : Phase 1 zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Meßlichtes bei unterschiedlichen Meßtechniken.
 Zellkonzentration : $2 \mu\text{l PCV/ml}$ Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$;
 Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

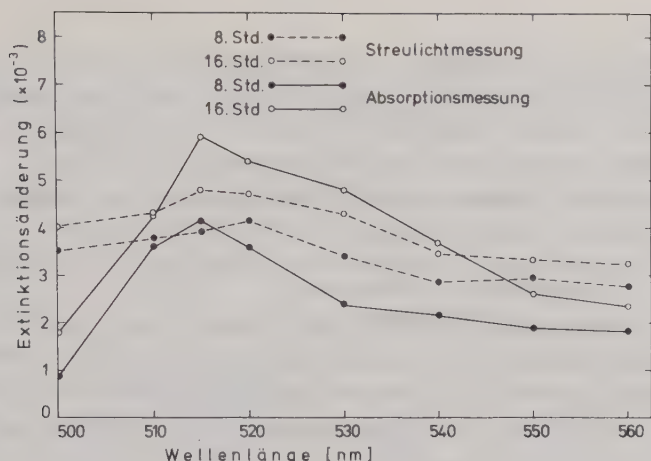


Abb. 26: Phase 1 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Meßlichtes bei unterschiedlichen Meßtechniken.

Zellkonzentration : 7 μ l PCV/ml Nährlösung;

Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm²sec;

Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

Auch Phase 1 selbst ist bei stärkerer Auflösung biphasig. Beide Phasenteile verschmelzen aber nach DCMU-Zugabe (Abb. 27, 28) in dichten Zellsuspensionen. Die verwendete DCMU-Konzentration hemmt den Elektronentransport vor Plastochinon. Während Phase 1 in dünnen Zellsuspensionen durch DCMU gehemmt wird, verringern die gleichen DCMU-Konzentrationen in dichten Suspensionen das Signal gar nicht, sondern bewirken einen sofortigen Anstieg des ersten Teiles des Signals auf die Höhe des zweiten Teiles, oder sogar noch eine Steigerung der Signalthöhe bei Absorptionsmessungen.

Die lichtinduzierte Reaktion in dünnen Zellsuspensionen ist demnach auf Grund der DCMU-Empfindlichkeit im wesent-

lichen von PS II abhängig, die Reaktion in dichten Zellsuspensionen von PS I. Dies bewiesen auch Anregungsversuche mit monochromatischem Licht (Abb. 29). Die Reaktionsgeschwindigkeit bei Belichtung mit Rotlicht ist bei dichten Suspensionen größer. Auch diese Befunde

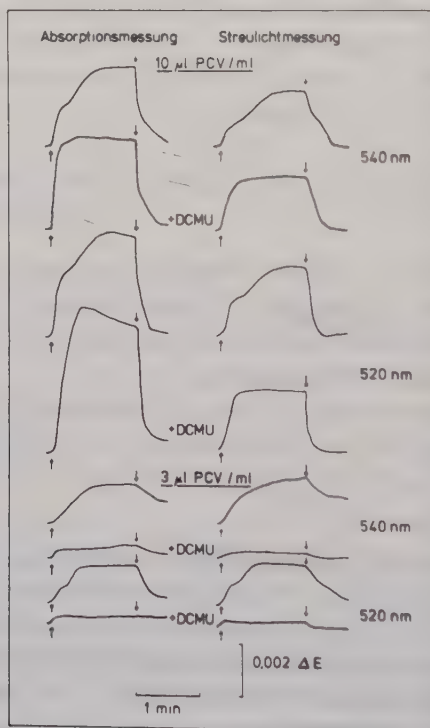


Abb. 27 : Phase 1 zur 20. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Meßlichtes bei unterschiedlichen Meßtechniken und verschiedenen Suspensionsdichten mit und ohne DCMU-Zugabe.

DCMU : 1×10^{-5} M;

Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm² sec;

Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

legen die Vermutung nahe, daß in Phase 1, je nach Suspensionsdichte, zwei verschiedene Effekte zum Ausdruck kommen.

In dünnen Zellsuspensionen handelt es sich um einen echten Streulichteffect mit einem Maximum der Meßwellenlänge bei 540 nm, der von PS II beeinflusst wird.

In dichten Suspensionen stellt Phase 1 eine echte lichtabhängige Absorptionsänderung dar, deren optimaler Meßwellenlängenbereich um 520 nm liegt und von DCMU nicht gehemmt werden kann, demnach von PS I angetrieben wird.

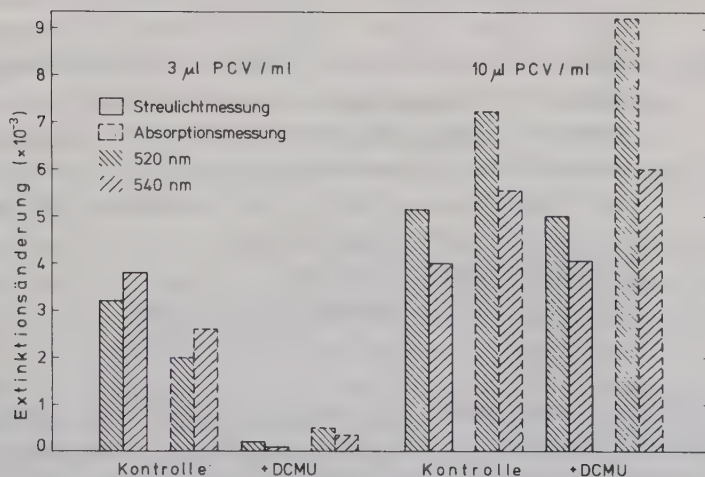


Abb. 28: Phase 1 zur 20. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte bei unterschiedlichen Meßtechniken und verschiedenen Meßwellenlängen mit und ohne DCMU-Zugabe.

DCMU : 1×10^{-5} M;

Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm²sec;

Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

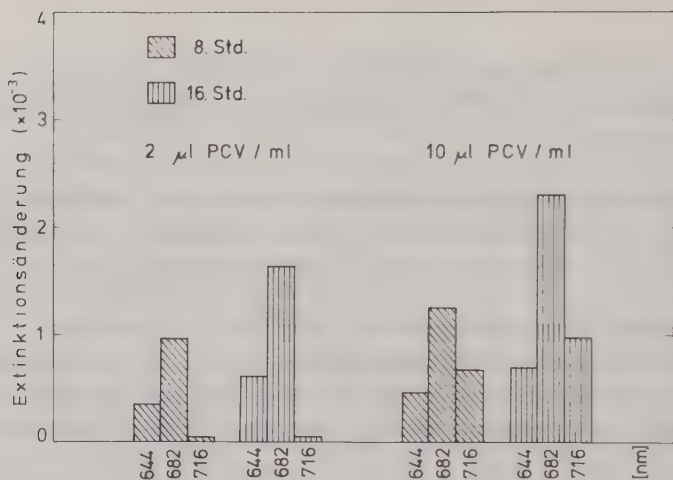


Abb. 29 : Phase 1 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes bei unterschiedlichen Suspensionsdichten.

Anregungslicht : DAL-Filter $\lambda = 644$ nm, 682 nm, 716 nm, 1×10^4 erg/cm² sec;

Meßwellenlänge : 540 nm;

Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

In solchen Suspensionen wird der Streulichteffekt durch Eigenabsorption der Zellen schon wesentlich vermindert und kann sich auf Grund der Suspensionsdichte nicht mehr voll auswirken. Dagegen ist die echte lichtabhängige Absorptionsänderung in Suspensionen mit wenigen Zellen sehr gering, der lichtabhängige Streulichteffekt dagegen sehr stark und überlagert die echte Absorptionsänderung.

Den lichtabhängigen Streulichtänderungen muß eine Struktur- oder Volumenänderung der Chloroplasten zugrunde liegen; möglicherweise spiegeln sie die Konformations- und Konfigurationsänderungen wider.

Bei der echten lichtabhängigen Absorptionsänderung könnte es sich um die 520 nm-Absorptionsänderung handeln, wie auch das Absorptionsmaximum bei 520 nm vermuten läßt. Auch dieser Effekt hat wiederum ein sehr komplexes Signal. Es besteht aus mehreren Signalteilen, einem sehr schnellen ($< 1 \mu \text{ sec}$) Teil und ein bis zwei langsameren Teilen (msec - sec) (MARSHO & HOMMERSAND, 1975), die aber durch Art und Folge der Lichtblitze (SENGER, 1970 b) und durch Hemmstoffzugabe ineinander übergehen können.

Der erste schnelle Signalteil konnte bei den vorliegenden Versuchen aus apparativen Gründen nicht erfaßt worden sein. PRATT & BISHOP (1968), SENGER (1970) und SENGER & BISHOP (1972) fanden die 520 nm-Absorptionsänderung bei Wildstamm und Mutanten von Scenedesmus obliquus; bei Ergrünung von Scenedesmus-Mutanten im Licht tritt das Signal zusammen mit der beginnenden PS II-Aktivität auf.

Über die Natur und den Ursprung dieses Signals bestehen noch Unklarheiten. Sowohl PS I, als auch PS II scheinen beteiligt zu sein. Die Reaktion der einzelnen Signalteile auf DCMU ist unterschiedlich: SENGER (1970) fand eine Hemmung des zweiten Signalteiles, andere (WITT et al., 1953; LARKUM & BONNER, 1972; KAUROV et al., 1974) eine völlige Hemmung des Signals durch DCMU, wieder andere Autoren sogar eine Steigerung (FORK & URBACH, 1966; GIMMLER, 1973; KULANDAIVELU, mündliche Mitteilung), wie sie auch in den vorliegenden Versuchen beobachtet werden konnte.

JUNGE & WITT (1968) nehmen einen Zusammenhang zwischen dem schnellen Teil der 520 nm-Absorptionsänderung und Potentialänderungen an Thylakoidmembranen und damit einen engeren Kontakt zur PP an (siehe auch JOLIOT & DELOSME, 1974). Entkoppler, die den Aufbau eines Membranpotentials hemmen, verhindern auch die 520 nm-Ab-

sorptionsänderungen (KAUROV et al., 1974). Die Membranpotentiale bewirken elektrochromatische Verschiebungen der Absorption von Chlorophyll- und Carotinoid-Pigmenten in den Membranen (BALTSCHIEFFSKY & HALL, 1974).

Die langsameren 520 nm-Absorptionsänderungen laufen nach MARSHO et al. (1975) in ihrer Kinetik parallel der der O_2 -Entwicklung und sind noch ungeklärten Ursprungs.

Unter den Meßbedingungen dieser Arbeit (Suspensionsdichte 1 - 2 μ l PCV/ml) dürfte eine echte lichtabhängige Absorptionsänderung (520 nm-Absorptionsänderung) gegenüber einem echten Streulichteffekt nicht ins Gewicht fallen; ein Anteil der echten Absorptionsänderung an Phase 1 kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Zur Beurteilung der Versuche, die von anderen Autoren durchgeführt wurden und die diesen relativ schnellen Effekt bei Streulichtmessungen beobachteten, muß daher die Suspensionsdichte, beziehungsweise der Chlorophyllgehalt beachtet werden.

Andererseits darf dieser Streulichteffekt bei der Interpretation vor allem der langsameren Teile der 520 nm-Absorptionsänderung nicht völlig außer acht gelassen werden.

Phase 1 in den vorliegenden Versuchen zeigt wahrscheinlich die Zusammenlagerung der Thylakoidmembranen an. Zur 16. Stunde, dem Zeitpunkt der niedrigsten Photosyntheseaktivität, ist die Extinktionszunahme der Phase 1 größer als zur 8. Stunde, dem Zeitpunkt optimaler Photosynthese.

Dies läßt darauf schließen, daß zur 16. Stunde die Membranen weniger dicht beieinander liegen. Die dadurch schlechtere Kopplung der beiden Photosysteme bewirkt möglicherweise auch die geringere Photosyntheseaktivität durch schlechtere Reoxidation von Plastochinon

(SENGER & FRICKEL-FAULSTICH, 1974; SENGHER et al., 1974).

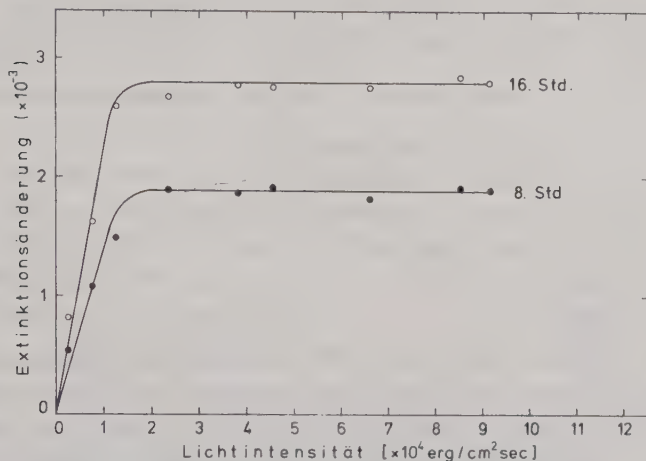


Abb. 30: Phase 1 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Intensität des Anregungslichtes.
 Zellkonzentration : 2 μ l PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm;
 Meßwellenlänge : 540 nm;
 Schutzfilter : Corning λ 380-570.

Phase 1 zeigt eine Abhängigkeit von der Intensität des Anregungslichtes (Abb. 30). Bei einer Lichtintensität von $1,5 - 2 \times 10^4$ erg/cm²sec knickt der lineare Teil der Kurve in den Sättigungsbereich ab.

4.2.3. Die langsame Extinktionsänderung

4.2.3.1. Abhängigkeit von der Meßtechnik und der Wellenlänge des Meßlichtes

Phase 2 ist in ihrem Ausmaß bei Scenedesmus etwa doppelt (16. Stunde) bis sechsfach (8. Stunde) so groß wie Phase 1. Es handelt sich hier um einen echten Streu-

lichteffekt, wie Abb. 31 zeigt. Der Extinktionszunahme muß demnach eine Struktur- und Volumenänderung des Chloroplasten zugrunde liegen. Der Unterschied zwischen

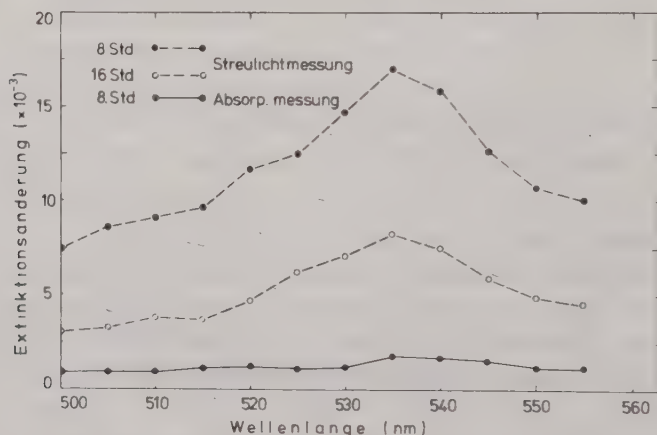


Abb. 31 : Phase 2 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Meßlichtes bei unterschiedlichen Meßtechniken.
 Zellkonzentration : 1,5 µl PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm² sec;
 Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm.

Streulicht- und Absorptionsmessung ist noch größer als bei Phase 1 des Signals. Bei Absorptionsmessungen ist praktisch keine Änderung von Phase 2 bei Belichtung mehr zu sehen.

In Abhängigkeit von der Meßwellenlänge zeigt Phase 2 ein ausgeprägtes Maximum bei 535 - 540 nm. Dies ist auch kennzeichnend für die von HEBER (1969) bei Chloroplasten in Blättern höherer Pflanzen, von GIMMLER (1973) bei Dunaliella und von MOHANTY & GOVINDJEE (1973) bei Anacystis beobachteten Streulichtänderungen und ent-

spricht damit den lichtabhängigen Volumenänderungen, die an isolierten Chloroplasten als Effekt der Thylakoidschrumpfung und der darauf folgenden Abnahme des Volumens ganzer Chloroplasten angesehen werden (PACKER et al., 1967; MURAKAMI & PACKER, 1970).

Der Sättigungsbereich wird relativ schnell erreicht (30 - 60 sec nach Belichtungsbeginn). Dieser Zeitraum entspricht auch etwa dem, den Chloroplasten höherer Pflanzen in vitro oder in vivo bis zum Abschluß der Schrumpfung benötigen (PACKER et al., 1967; HEBER, 1969).

Bei manchen Entwicklungsstadien der Zelle ist eine kurze Verzögerungsphase zwischen dem ersten und zweiten Teil des Signals zu sehen. Zur 16. Stunde scheint der Chloroplast langsamer auf die Belichtung zu reagieren; sowohl Phase 1 als auch Phase 2 benötigen länger zur Erreichung des Maximums.

Wodurch die Extinktionsabnahme zwischen Phase 1 und 2 hervorgerufen wird, ist unklar. Diese Abnahme, die sogar ein Sinken der Extinktion unter den Ausgangswert bewirken kann, zeigt möglicherweise ein echtes Anschwellen von Chloroplastenstrukturen an. Versuche mit kurzen Belichtungszeiten beweisen, daß es sich dabei nicht um eine Reversibilität von Phase 1 während der Lichtzeit handelt. Da es auch keine echte lichtabhängige Absorptionsänderung ist, muß es eine Volumenzunahme im Chloroplasten anzeigen. Wie noch in anderen Versuchen gezeigt wird, kann diese Extinktionsabnahmephase zwischen Phase 1 und 2 unter Umständen sehr stark werden (siehe Kap. 4.2.6.).

Von Anacystis ist bekannt (MOHANTY & GOVINDJEE, 1973), daß bei Belichtung eine relativ starke Extinktionsabnahme erfolgt, die nach Belichtungsende voll reversibel ist. Durch eigene Versuche mit Anacystis konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Nach einer kurzen Extinktionszunahme nimmt die Extinktion sehr stark ab, erreicht schließlich einen Sättigungswert, auf den

manchmal wieder eine leichte Extinktionszunahme folgt. Im Gegensatz zu den Volumenabnahmen bei Belichtung (KRAUSE, 1973) läuft diese Volumenzunahme nicht der Chlorophyll a-Fluoreszenz parallel (MOHANTY & GO-VINDJEE, 1973); daraus wurde geschlossen, daß diese makroskopische Volumenzunahme die eigentlichen Konformationsänderungen, die mit der Chlorophyll-Fluoreszenz in Verbindung stehen, überdeckt. Die eigentliche Ursache dieser Volumenzunahme ist nicht geklärt.

4.2.3.2. Abhängigkeit von Wellenlänge und Intensität des Anregungslichtes

Phase 2 ist von PS II abhängig; dies zeigt das Aktionspektrum (Abb. 32), das den Absorptionsspektren der photosynthetisch aktiven Pigmente folgt (SENGER, 1970).

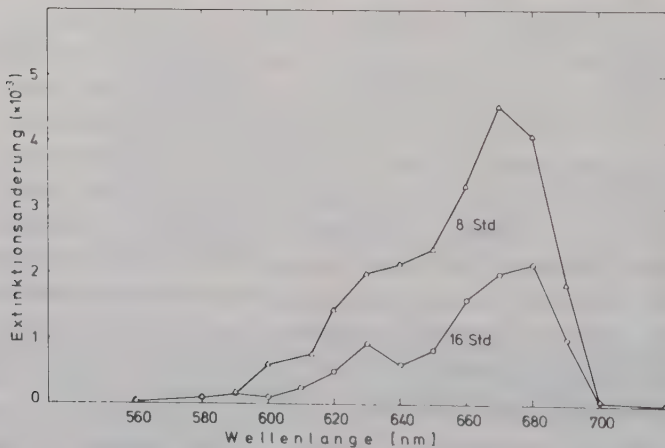


Abb. 32: Phase 2 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes.
 Zellkonzentration : $1,5 \mu\text{l}$ PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $2,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$;
 Meßwellenlänge : 554 nm; Schutzfilter : IL λ 554nm.

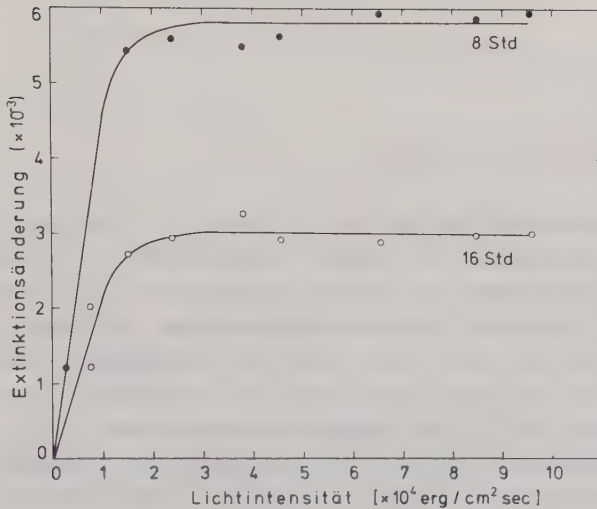


Abb. 33 : Phase 2 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Intensität des Anregungslichtes.
 Zellkonzentration : 1,5 μ l PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm; Meßwellenlänge: 554 nm;
 Schutzfilter: IL λ 554 nm.

PS I-Licht ($\lambda > 700$ nm) allein ruft keine Volumenänderungen in Scenedesmus-Zellen hervor. Zwischen den Aktionsspektren zur 8. und 16. Stunde besteht eine leichte Verschiebung in dem Maximum zum längerwelligen Bereich, wie sie auch von SENER (1970) bei Scenedesmus für die Photosyntheseaktivität in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslicht beobachtet wurde.

Bei Änderungen der Lichtintensität des Anregungslichtes ergeben sich Sättigungskurven für Phase 2 (Abb. 33), die denen von Phase 1 (Abb. 30), aber auch denen der Photosyntheseaktivität (SENER, 1970) entsprechen. Beide Signale weisen also in bezug auf ihre Lichtintensitätsabhängigkeit und ihre Aktionsspektren auf einen engen Zusammenhang mit den photosynthetischen Primär-

prozessen hin.

4.2.3.3. Hemmstoffzugabe

Dem Aktionsspektrum entspricht auch die DCMU- und DBMIB-Hemmbarkeit der Phasen 1 und 2 (Abb. 34). Beide hemmen das Signal völlig und verhindern also lichtabhängige Struktur- und Volumenänderungen. Da diese Hemmstoffe zur 16. Stunde nicht in Scenedesmus-Zellen eindringen konnten, wurde die DCMU-Hemmbarkeit zur 16. Stunde bei Chlamydomonas überprüft (Abb. 22). DCMU hemmt hier auch zur 16. Stunde Phase 2 völlig, Phase 1 nicht ganz, was wahrscheinlich auf einen Anteil der 520 nm-Absorptionsänderung beruht.

AA-Zugabe hat keinen Einfluß auf das Gesamtsignal zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus (Abb. 35).

Geht man von der Annahme aus, daß eine Volumenabnahme des Chloroplasten einer Erhöhung des Phosphorylierungspotentials (siehe Kap. 1.4.3.) in den Chloroplasten entspricht, eine Volumenzunahme einer Potentialerniedrigung, so kann man aus dem Aktionsspektrum, der DBMIB- und DCMU-Hemmbarkeit und der AA-Nichthemmbarkeit schließen, daß zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus die Phosphorylierung allein von der nicht-zyklischen PP getrieben wird. Ein möglicher Anteil der pseudo-zyklischen PP am Phosphorylierungspotential kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Dies stimmt mit den Befunden der direkten ATP-Pool-Messungen (Kap. 1.4.) und mit Literaturdaten (GIMMLER, 1973; KRAUSE, 1973) überein. Auch zur 16. Stunde ist keine zyklische PP vorhanden, was ja ebenfalls die ATP-Messungen zeigten.

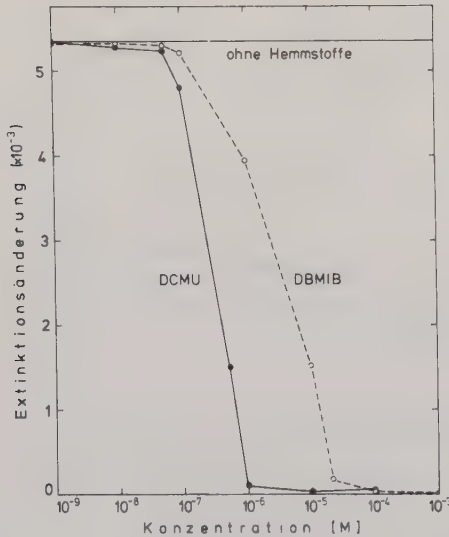


Abb. 34 : Phase 2 zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der DCMU-bzw. DBMIB-Konzentration.
 Zellkonzentration : 1,5 μ l PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm² sec;
 Meßwellenlänge : 554 nm; Schutzfilter: IL λ 554nm.

4.2.4. Lichtabhängige Konformationsänderungen während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus und Chlorella

Messungen lichtinduzierter Konformationsänderungen während des Entwicklungszyklus zeigen demnach den Verlauf der nicht-zyklischen PP während der Zelldifferenzierung an.

Die langsamen Extinktionszunahmen steigen bei Scenedesmus obliquus bis zur 8. Stunde an, nehmen dann ab und erreichen ein Minimum zur 16. Stunde, dem Zeitpunkt niedrigster Photosyntheseaktivität, kurz vor der Zelltei-

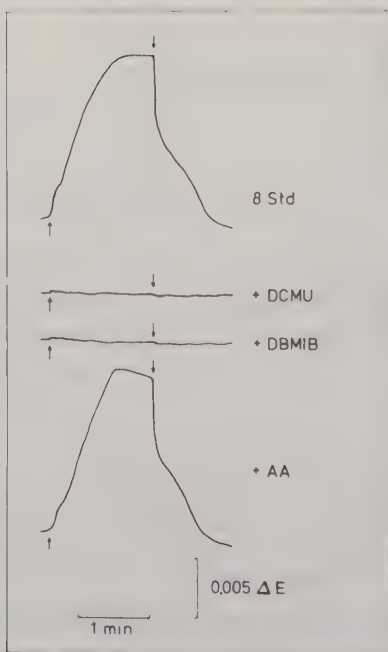


Abb. 35: Phase 2 zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von den zugegebenen Hemmstoffen.

DCMU : $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; DBMIB : $5 \times 10^{-5} \text{ M}$;

AA : $1 \times 10^{-4} \text{ M}$;

Zellkonzentration : $1,5 \mu\text{l PCV/ml}$ Nährlösung;

Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$;

Meßwellenlänge : 540 nm ; Schutzfilter : Corning $\lambda 380-570 \text{ nm}$.

teilung. Anschließend steigt die Extinktionszunahme wieder geringfügig bis zum Ende der Dunkelzeit an (Abb.36).

Die schnellen Extinktionsänderungen (Phase 1) verhalten sich anders: Während der Lichtzeit bleiben sie mehr oder weniger konstant, steigen dann bis zur 18. Stunde an und sinken dann wieder ab (Abb. 37).

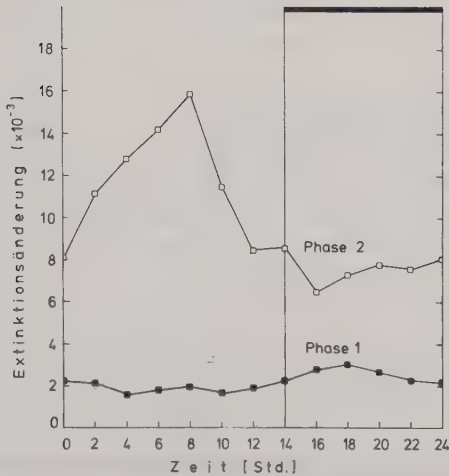


Abb. 36: Lichtinduzierte Konformationsänderungen (Phase 1 und Phase 2) einer Synchronkultur von Scenedesmus. Zellkonzentration : $1,5 \mu\text{l}$ PCV/ml Nährlösung; Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $9 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$; Meßwellenlänge : 540 nm ; Schutzfilter : Corning $\lambda 380-570 \text{ nm}$.

Die nicht-zyklische PP hat also ein Maximum zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus und ein Minimum zur 16. Stunde und stimmt damit genau mit dem Verlauf der Photosyntheseaktivität während des Synchronzyklus überein.

Bei Chlorella ist der Kurvenverlauf der langsamen Extinktionszunahme (Phase 2) ähnlich (Abb. 37), nur liegt das Minimum nicht zur 16., sondern erwartungsgemäß zur 18. Stunde, dem Zeitpunkt des Beginnes der Autosporenfreisetzung bei Chlorella.

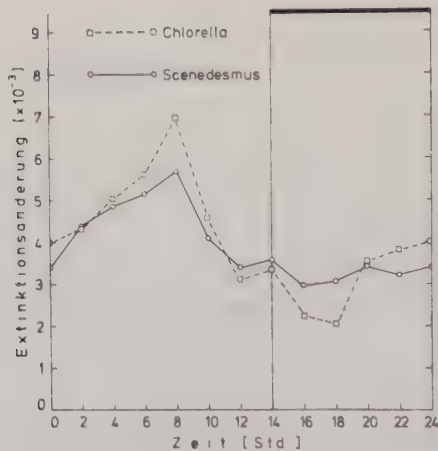


Abb. 37 : Lichtinduzierte Konformationsänderungen (Phase 2) einer Synchronkultur von Scenedesmus und Chlorella.

Zellkonzentration : 1,5 μ l PCV/ml Nährlösung;
 Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm² sec;
 Meßwellenlänge : 540 nm; Schutzfilter: Corning
 λ 380-570 nm.

Abb. 38 zeigt zum Vergleich den Photosyntheseverlauf bei synchronen Scenedesmus- und Chlorella- Kulturen, der in der Lage der Maxima und Minima genau mit dem Verlauf der Konformationsänderungen übereinstimmt.

Der 16-Stunden-Wert der Phase 2 liegt bei Scenedesmus fast 50% unter dem der 8. Stunde, der 18-Stunden-Wert bei Chlorella fast um 70%. Die Photosyntheseaktivität schwankt um rund 40 - 50 % bei beiden. Dies spricht für eine schlechtere Kopplung der ATP-Bildung mit dem nicht-zyklischen Elektronentransport zur 18. Stunde bei Chlorella.

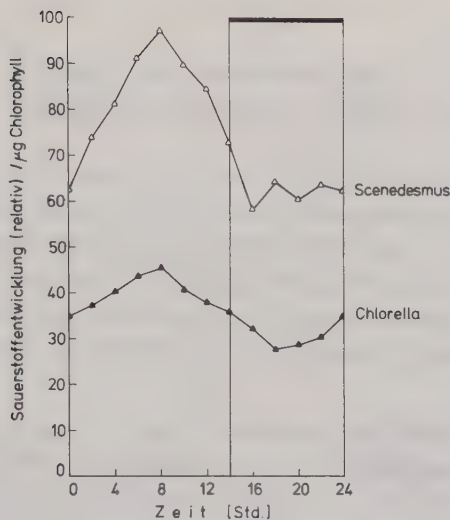


Abb. 38: Photosyntheseleistung (polarographisch) einer Synchronkultur von Scenedesmus und Chlorella. 20 µl PCV Algen waren in 2 ml Sörensenpuffer pH 7, 0,05 M suspendiert. Lichtintensität : $3,6 \times 10^5$ erg/cm²sec; Wellenlänge : $\lambda > 630$ nm. (Aus WERTHMÜLLER, 1975, verändert).

Phase 1 dagegen zeigt das Zusammenlagern der Thylakoidmembranen an (Kap. 4.2.2.); während der Dunkelzeit hat diese Zusammenlagerung ein größeres Ausmaß als zur Lichtzeit.

Änderungen der Wachstumsbedingungen der Scenedesmus- und Chlorella-Kulturen von autotropher zu mixotropher und photo-heterotropher Anzucht bewirken zwar einen anderen Kurvenverlauf der Konformationsänderungen über den Zyklus, aber auch hier stimmt er gut mit dem der Photosynthesekapazitätsänderungen während des synchronen Wachstums in der Lage der Maxima und Minima überein, nicht aber in deren Größe (siehe Kap. 5.) (WERTHMÜLLER, 1975).

4.2.5. Verhalten lichtinduzierter Konformationsänderungen unter anaeroben Bedingungen

Es stellte sich nun die Frage, wie sich die lichtinduzierten Konformationsänderungen unter anaeroben Bedingungen verhalten, unter denen ja nachgewiesenermaßen eine zyklische PP ablaufen kann (siehe Kap. 4.1.1.1.) und ob sie auch unter diesen Verhältnissen Erhöhungen des Phosphorylierungspotentials auf Grund der zyklischen PP anzeigen.

Bei Scenedesmus kann die Aktivität von PS I mit Hilfe der Photoreduktion (SENGER, 1970) gemessen werden.

Algen, die sich unter P h o t o r e d u k t i o n s b e d i n g u n g e n befanden, also in einer H_2/CO_2 -Atmosphäre gehalten wurden und schon eine Hydrogenase² gebildet hatten, wurden im Spektralphotometer mit Rotlicht belichtet.

Es ergeben sich Signale, die zur 8. und 20. Stunde das gleiche Aussehen haben (Abb. 39). Die 16. Stunde konnte nicht vermessen werden, da DCMU als Inhibitor von PS II zugegeben worden war.

Nach einem kurzen Extinktionsanstieg erfolgt eine starke Abnahme, möglicherweise einer Volumenzunahme entsprechend, dann wieder eine leichte Extinktionszunahme. Nach Belichtungsende ist das Signal reversibel. Einer kurzen Extinktionsabnahme folgt eine lang andauernde, allmähliche Extinktionszunahme, deren Dauer etwa das 3 - 4 fache der lichtinduzierten Extinktionsabnahme ausmacht. Eventuell überlagert dabei die starke Extinktionszunahme die Extinktionsabnahme, die auf Grund der Änderungen im Licht größer sein müßten, als gemessen werden konnte. Das Signal ist im Prinzip das gleiche wie unter aeroben Verhältnissen, nur daß die Extinktionsabnahme zwischen Phase 1 und 2 unter diesen Bedingungen sehr viel stärker ist, Phase 2 dagegen nur sehr klein.

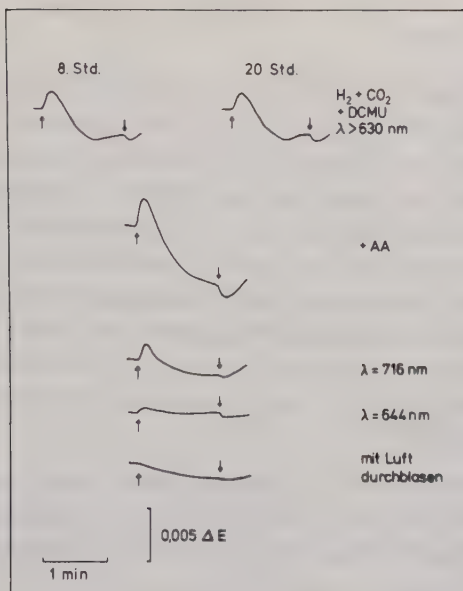


Abb. 39: Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 20. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter Photoreduktionsbedingungen (H_2/CO_2 -Atmosphäre) mit und ohne Hemmstoffzugabe.

DCMU : 1×10^{-5} M; AA : 1×10^{-4} M;
 Zellkonzentration : $5 \mu\text{l}$ PCV/ml Sörensenpuffer, 0,05 M, pH 7,0;
 Anregungslicht : $\lambda > 630 \text{ nm}$, $5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$;
 Meßwellenlänge : 540 nm; Schutzfilter : Corning λ 380-570 nm;
 Monochromatisches Licht : DAL-Filter $\lambda = 716 \text{ nm}$, 644 nm, Lichtintensität : $1 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$.

Bei Phase 1 handelt es sich möglicherweise um eine echte Absorptionsänderung, da mit einer relativ hohen Suspensionsdichte gearbeitet wurde; andererseits kann unter diesen Bedingungen eine zyklische PP ablaufen, und es

könnte dieser Phase 1 eine echte Streulichtänderung zugrunde liegen, verursacht durch Konformations- und Konfigurationsänderungen der Membranen, die dann natürlich auch nicht DCMU-hemmbar sein dürfen. Interpretiert man die Konformationsänderungen als Änderungen des Phosphorylierungspotentials, so sinkt das Phosphorylierungspotential unter Photoreduktionsbedingungen bei Belichtung zuerst stark ab und nimmt dann wieder zu. Diese Zunahme muß auf einer ATP-Produktion durch die zyklische PP beruhen, da nicht-zyklische und pseudo-zyklische PP durch DCMU gehemmt sind.

Phase 2 ist zur 8. und 20. Stunde etwa gleich groß. Dies stimmt mit den Befunden über die PS I-Aktivität während des Entwicklungszyklus (SENGER, 1970) sehr gut überein.

Zugabe von AA, einem Hemmstoff der zyklischen PP, verursacht eine Verstärkung von Phase 1, eine noch stärkere Extinktionsabnahme und ein Verschwinden von Phase 2 bei Belichtung.

Durchbläst man die Probe kurzfristig mit Luft, so wird die sehr sauerstoffempfindliche Hydrogenase zerstört und es kann keine Photoreduktion mehr ablaufen; das Signal ist nun wieder DCMU-hemmbar.

Unter N_2 - A t m o s p h ä r e sind die Signale nur noch einphasig (Abb. 40) und die Extinktionszunahme ist wesentlich schwächer als unter aeroben Bedingungen. DCMU-Zugabe verhindert bei starker Belichtung das Signal völlig, bei geringeren Intensitäten des Anregungslichtes treten auch hier wieder einphasige Signale auf, die sich nicht von denen ohne Hemmstoffzugabe unterscheiden. Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei diesen Messungen keine durchgehende Begasung durchgeführt werden konnte, wie es bei den ATP-Messungen der Fall war. Daher ist es möglich, daß trotz anaerober Atmosphäre vor allem bei

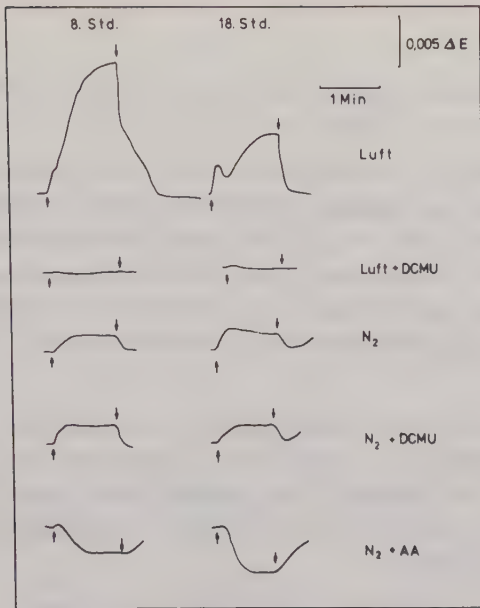


Abb. 40: Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 18. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus unter aeroben und anaeroben (N_2) Bedingungen mit und ohne Hemmstoffzugabe. DCMU : 1×10^{-5} M; AA : 1×10^{-4} M; Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm, Lichtintensität unter aeroben Bedingungen : 9×10^4 erg/cm²sec, unter anaeroben Bedingungen : $2,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; Meßwellenlänge : 540 nm; Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm.

hohen Lichtintensitäten Sauerstoff entwickelt wird, der eine zyklische PP verhindert (siehe auch HEBER, 1969). Welche Phase des Signals weggefallen ist, ist schwer zu entscheiden. WIEGAND (1974) fand bei Chloroplasten höherer Pflanzen in vivo nach Stickstoffbegasung einen Wegfall von Phase 2. Übrig blieb nur Phase 1, bei der es sich um eine 520 nm-Absorptionsänderung handelte. HEBER (1969) dagegen fand bei Chloroplasten höherer Pflanzen

in vivo eine Potentialerhöhung unter anaeroben Bedingungen durch eine zyklische PP.

AA-Zugabe verändert die Signale stark, sie ähneln dann denen nach AA-Hemmung unter Photoreduktionsbedingungen. Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit der Hemmung von der Lichtintensität. Der Extinktionsanstieg bei Belichtung beruht demnach wohl doch auf einer Erhöhung des Phosphorylierungspotentials durch die zyklische PP.

Die Unterschiede zwischen den beiden Signalthöhen zur 8. und 18. Stunde sind sehr gering; also ist die zyklische PP zu diesen Zeitpunkten fast gleich groß. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden direkter ATP-Pool-Bestimmungen (Kap. 4.1.4.).

4.2.6. Verhalten lichtinduzierter Konformationsänderungen in zellfreien Systemen

Da nicht alle chemischen Substanzen in die Zelle hinein können (z.B. PMS bei Scenedesmus) oder zumindest nicht zu allen Zeitpunkten permeieren können, wurden Versuche an zellfreien Systemen von Scenedesmus obliquus durchgeführt. Auch diese Partikel zeigen noch lichtinduzierte Streulichtänderungen, einer Volumenabnahme der Membranen und Vesikel entsprechend (Abb. 41). Die Einteilung in Phase 1 und 2 bleibt erhalten, auch wenn vor allem zur 8. Stunde Phase 1 kaum meßbar ist. Die Größenverhältnisse von Phase 2 zwischen der 8. und 16. Stunde stimmen mit denen ganzer Zellen zu diesen Zeitpunkten überein: die Extinktionszunahme zur 16. Stunde ist um rund 40% niedriger als zur 8. Stunde (Abb. 42, 43).

Die Extinktionsänderungen der Partikel bei Belichtung sind wesentlich kleiner als die der ganzen Zellen.

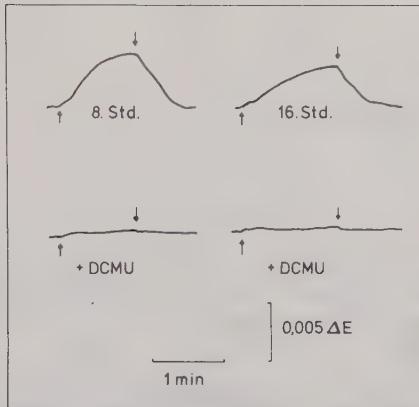


Abb. 41: Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in zellfreien Systemen mit und ohne DCMU-Zugabe.

DCMU: 5×10^{-6} M; Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm,
 9×10^4 erg/cm²sec; Meßwellenlänge: 540 nm;
 Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm;
 Chlorophyllkonzentration: 6,3 µg/l.

Die Extinktionsänderungen der Partikel bei Belichtung sind wesentlich kleiner als die ganzer Zellen. Von den Chloroplasten sind nur noch Bruchstücke vorhanden, und die Zusammenlagerung der Membranen und die Volumenänderungen von Vesikeln rufen keine so großen Streulichtänderungen mehr hervor. Auch diese Änderungen sind bei Belichtungsende reversibel.

Von Chloroplasten-Partikeln höherer Pflanzen sind ebenfalls lichtinduzierte Schrumpfsreaktionen bekannt (NEUMANN & JAGENDORF, 1964; GROSS & PACKER, 1965; SHAVIT & AVRON, 1967).

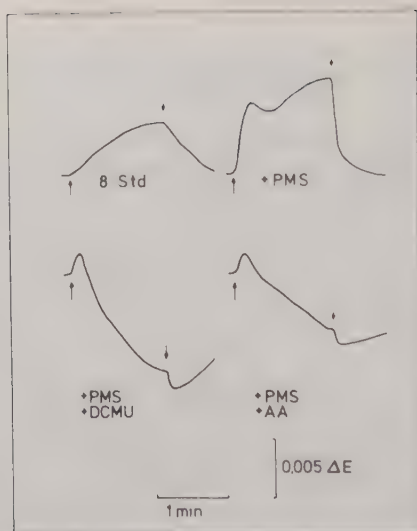


Abb. 42: Lichtinduzierte Konformationsänderungen zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von Scene-desmus in zellfreien Systemen mit und ohne Hemmstoffzugabe.

DCMU : 5×10^{-6} M; AA : 1×10^{-5} M; PMS : 1×10^{-6} M;
 Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm²sec;
 Meßwellenlänge : 540 nm;
 Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm;
 Chlorophyllkonzentration : 6 µg/l.

Der Phase 2 liegen Struktur- und Volumenänderungen zugrunde, die denen ganzer Zellen entsprechen, wie die Ähnlichkeit der Absorptionsspektren der Partikel (Abb. 43) und der ganzer Zellen (Abb. 31) vermuten lassen.

DCMU-Zugabe hemmt Phase 2 zur 8. und 16. Stunde völlig. Phase 1 bleibt auch dann noch teilweise erhalten, was, zusammen mit seinem Absorptionsmaximum bei 520 nm (Abb. 43) darauf hinweist, daß es sich hierbei um den Einfluß der 520 nm-Absorptionsänderung handelt, der in der relativ

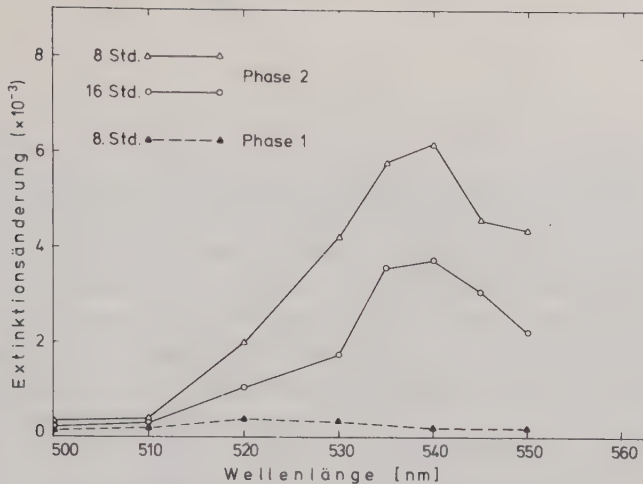


Abb. 43: Phase 1 zur 8., Phase 2 zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Meßlichtes in zellfreien Systemen.

Anregungslicht : $\lambda > 630$ nm, 9×10^4 erg/cm²sec;

Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm;

Chlorophyllkonzentration : 6,3 μ g/l.

dichten Partikelsuspension überwiegt.

Zugabe von PMS, einem Cofaktor einer zyklischen PP, die nicht der normalen Ferredoxin-katalysierten zyklischen PP entspricht, bewirkt eine starke Steigerung von Phase 1, während Phase 2 nach einer kurzen Verzögerungsphase sich fast gar nicht ändert. Zusätzliche DCMU-Zugabe vermindert Phase 1 um etwa zwei Drittel seiner Höhe, Phase 2 dagegen verschwindet ganz; statt dessen ist ein starkes Anschwellen zu beobachten. PMS scheint unter diesen Bedingungen keine zyklische PP zu katalysieren.

Die starke Erhöhung von Phase 1 beruht wahrscheinlich auf einem Einfluß von PMS auf die 520 nm-Absorptionsänderung.

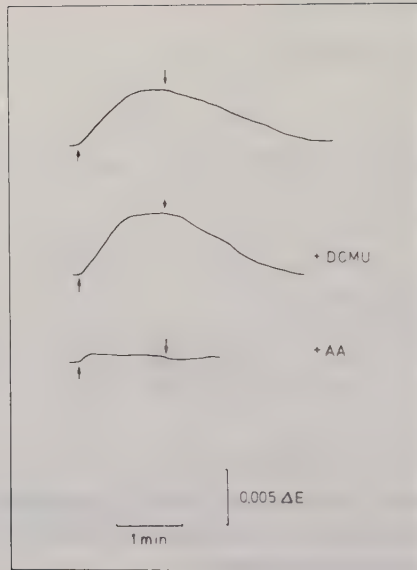


Abb. 44: Lichtinduzierte Konformationsänderungen bei der Scenedesmus-Mutante 6E mit und ohne Hemmstoffzugabe.

DCMU: 1×10^{-5} M; AA: 1×10^{-4} M;

Zellkonzentration: 2,0 μ l PCV/ml Nährlösung;

Anregungslicht: $\lambda > 630$ nm, 2×10^4 erg/cm²sec;

Meßwellenlänge: $\lambda = 540$ nm;

Schutzfilter: Corning λ 380-570 nm.

AA beeinflusst das normale Signal bei belichteten Partikeln nicht, ändert es aber nach PMS-Zugabe. An der durch die Extinktionszunahme angezeigten Potentialerhöhung ist also auch bei Partikeln nur die nicht-zyklische PP beteiligt.

Warum nach PMS-Zugabe AA eine Wirkung hat, ist unklar. Die durch PMS katalysierte zyklische PP ist normalerweise nicht durch AA hemmbar.

Andererseits scheint ja an dem PMS-katalysierten Signal keine zyklische PP beteiligt zu sein, da es durch DCMU

hemmbar ist.

TAMAI (1970) beobachtete bei isolierten Spinatchloroplasten nach PMS- und AA-Zugabe einen ähnlichen Effekt. Auch hier folgte einem Anschwellen des Chloroplasten bei Belichtung eine durch AA hemmbare Schrumpfungsphase. TAMAI interpretierte den Wechsel zwischen Schwellen und Schrumpfen als Ausdruck einer Konkurrenz um die Nutzung energiereicher Zwischenstoffe, die durch PMS-katalysierte Reaktionen gebildet werden.

4.2.7. Lichtinduzierte Konformationsänderungen bei einer Scenedesmus-Mutante ohne PS II

Die Mutante 6E besitzt nur PS I (BISHOP, 1973) und kann deshalb nur durch eine zyklische PP ATP produzieren. Bei Belichtung zeigt diese Mutante eine Extinktionszunahme. Eine Unterteilung des Signals in mehrere Phasen ist nicht möglich (Abb. 44). Das Signal ist nach Belichtungsende langsam reversibel. Die Extinktionszunahme sollte einer Erhöhung des Phosphorylierungspotentials durch die zyklische PP entsprechen. Erwartungsgemäß war das Signal auch nicht durch DCMU hemmbar, während es durch AA-Zugabe fast völlig gelöscht wird.

In der Scenedesmus-Mutante 6E läuft demnach unter aeroben Bedingungen eine zyklische PP ab.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Existenz einer zyklischen PP in vivo ist noch immer umstritten. Unter anaeroben Bedingungen ist sie mit Sicherheit nachgewiesen (HEBER, 1969; GIMMLER et al., 1971; URBACH & KAISER, 1972). Fraglich ist, ob sie auch unter aerober Atmosphäre ablaufen kann.

Aus den vorliegenden Versuchen geht klar hervor, daß eine zyklische PP unter den gegebenen Umständen in Luft bei autotroph angezogenen Scenedesmus-Kulturen nicht meßbar ist, weder durch ATP-Pool-Bestimmungen nach Dunkel-Licht-Wechseln, noch durch Messungen des Phosphorylierungspotentials in den Chloroplasten. Das gleiche gilt für Chlorella und Chlamydomonas, wo jedoch nur das Phosphorylierungspotential überprüft wurde. Auch wenn alle anderen PP ausgeschaltet werden, konnten sie unter aeroben Bedingungen nicht durch eine zyklische PP ersetzt werden.

Daraus kann aber nicht geschlossen werden, daß unter aeroben Bedingungen keine zyklische PP ablaufen kann. Dies beweisen die Versuche mit der Scenedesmus-Mutante 6E, die nur zyklische PP durchführen kann. Hier konnte auch unter aeroben Bedingungen eine zyklische PP durch Zunahme des Phosphorylierungspotentials beobachtet werden.

In mixotroph angezogenen Scenedesmus-Kulturen läuft möglicherweise eine zusätzliche zyklische PP ab, da Elektrentransport und Phosphorylierungspotential sich unter den verschiedenen Entwicklungsbedingungen unterschiedlich stark verändern (WERTHMÜLLER, 1975).

Ebenso läuft mit Sicherheit bei den Blaualgen Anacystis und Synechococcus eine zyklische PP in vivo ab (BEDELL & GOVINDJEE, 1973; BORNEFELD & SIMONIS, 1974; MOHANTY & GOVINDJEE, 1974).

An intakten Zellen höherer Pflanzen kann unter aeroben Bedingungen keine zyklische PP nachgewiesen werden, allerdings konnte an isolierten Chloroplasten eine endogene zyklische PP unter aeroben Bedingungen nach DCMU-Hemmung

beobachtet werden (KAISER & URBACH, 1972).

Es erhebt sich nun die Frage, worauf es beruhen könnte, daß die zyklische PP bei Scenedesmus unter den gegebenen Umständen in Luft nicht abläuft, obwohl die Alge durchaus in der Lage ist, diesen Phosphorylierungstyp durchzuführen, wie Versuche unter anaeroben Bedingungen zeigen, unter denen ohne weiteres sofort eine Umschaltung zwischen zyklischer und nicht-zyklischer PP möglich war.

Das gleiche Problem besteht entsprechend auch für höhere Pflanzen.

Eine generelle Sauerstoffempfindlichkeit kann nicht als Ursache herangezogen werden. Dies zeigen die oben genannten Beobachtungen. URBACH & GIMMLER (1970) untersuchten die PP in Luft mit und ohne CO_2 und stellten fest, daß die nicht-zyklische PP in Luft + CO_2 überwiegt, in Luft - CO_2 nur eine zyklische PP abläuft, wie es auch in N_2 ohne CO_2 der Fall ist. Auch dies ist ein Hinweis darauf, daß nicht unbedingt eine Sauerstoffempfindlichkeit die zyklische PP in vivo verhindert.

Die CO_2 -Konzentration allein kann aber auch nicht der limitierende Faktor sein, da unter Stickstoff-Atmosphäre mit oder ohne CO_2 -Zusatz eine zyklische PP abläuft.

Für die Existenz einer pseudozyklischen PP ergeben die vorliegenden Versuche keinen Anhaltspunkt. Sie wird jedoch für höhere Pflanzen (HEBER, 1969, 1973; KRAUSE, 1973; HOCH et al., 1963; JACKSON & VOLK, 1969; RAVEN, 1970) und für Algen (KYLIN et al., 1972) angenommen.

Die Existenz verschiedener Phosphorylierungstypen wirft das Problem der Regulation zwischen ihnen auf.

Möglicherweise könnte Plastochinon, in das ja der zyklische Elektronentransport nach den durchgeführten Versuchen wieder in den offenkettigen einmündet, die Umschaltstelle zwischen zyklischer und nicht-zyklischer PP darstellen.

Nach Versuchen von SENGER & FRICKEL-FAULSTICH (1974) reguliert Plastochinon den Ablauf zwischen zyklischem und nicht-zyklischem Elektronentransport. Verminderte Reduktion des Plastochinon-Pools durch Herabsetzung des nicht-zyklischen Elektronentransportes könnte einen zyklischen Elektronenfluß begünstigen.

Ferredoxin wird oft als Regulationsstelle zwischen den Phosphorylierungen angesehen (JESCHKE et al., 1969; HEBER, 1973). Je nach Reduktionsgrad des Ferredoxins, verursacht durch die Stärke des ablaufenden Calvin-Zyklus aufgrund des ATP-Angebotes, laufen nicht-zyklische, pseudo-zyklische oder zyklische PP ab. Durch die Elektronenaffinität der Akzeptoren wird erreicht, daß nur dann eine zyklische PP ablaufen kann, wenn die nicht-zyklische oder pseudo-zyklische abgesättigt ist.

GRANT & WHATLEY (1967) konnten für isolierte aufgebroschene Chloroplasten eine Abhängigkeit der zyklischen PP vom Redoxpotential des Ferredoxin nachweisen.

ARNON (1966) vermutet in NADPH den Regulationsort zwischen zyklischer und nicht-zyklischer PP.

Auch Cytochrom b_{563} könnte an einer Regulation beteiligt sein. Die Rolle dieses Cytochroms im Elektronentransport wird heute im allgemeinen im zyklischen Elektronentransport angenommen (BÖHME & CRAMER, 1972). BÖHME et al. (1973) beobachteten in isolierten Chloroplasten eine Verlagerung des Redoxpotentials von Cytochrom b_{563} in Gegenwart von Entkopplern zu einem negativeren Redoxpotential, so daß es von PS II nicht mehr reduziert werden kann und schlossen daraus auf eine mögliche regulatorische Funktion dieses Vorganges für die Teilnahme am zyklischen oder nicht-zyklischen Elektronentransport, falls diese Verlagerung auch in vivo ohne Gegenwart von Entkopplern möglich ist.

Da für Synchronkulturen eindeutig bewiesen werden konnte, daß der offenkettige Elektronentransport reguliert wird, andererseits aber die CO_2 -Fixierungspotenz mit Hilfe des

PS I über den Zyklus konstant bleibt, ist die Annahme eines Regulationsortes hinter PS I für Synchronkulturen einzelliger Algen unwahrscheinlich. - Es muß daher der Reoxidierbarkeit des Plastochinons als Regulator des Elektronentransportes der Vorzug gegeben werden.

Die nicht-zyklische PP folgt erwartungsgemäß den Änderungen der Photosyntheseaktivität von Scenedesmus während des Synchronzyklus. Dies trifft auch für die unter anaeroben Bedingungen ablaufende PP zu, wie ATP-Pool-Messungen zeigten. Dieser Befund steht mit der Annahme, daß beide Elektronentransporte durch Plastochinon verlaufen, in vollem Einklang.

Versuche mit lichtinduzierten Streulichtänderungen unter Photoreduktionsbedingungen dagegen ergaben eine gleichgroße zyklische PP zur 8. und 16. Stunde, was mit den gefundenen PS I-Aktivitäten während der Zelldifferenzierung (SENGER, 1970), einer gleichbleibenden Pool-Größe von Cytochrom b_{563} (SENGER & FRICKEL-FAULSTICH, 1974) und den Befunden von GIMMLER et al. (1971) übereinstimmen würde.

Allerdings ist damit aber die bisher vertretene Hypothese (SENGER & FRICKEL-FAULSTICH, 1974), daß die zyklische PP zum Zeitpunkt der geringsten Photosyntheseaktivität und damit der geringsten nicht-zyklischen PP zusätzlich ATP produziert, zu verwerfen.

Um unter diesen Umständen im Stadium geringster Photosyntheseleistung genügend ATP für die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus bereitstellen zu können, muß entweder eine zusätzliche pseudo-zyklische PP ablaufen, was nach den Quantenbedarfsmessungen unwahrscheinlich ist, oder ATP aus der oxidativen P kommen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. In autotrophen synchronen Kulturen von Scenedesmus obliquus tritt unter normalen aeroben Bedingungen keine zyklische PP bei Belichtung auf. Dies konnte mit einer direkten (ATP-Pool-Bestimmung bei Dunkel-Licht-Wechseln) und einer indirekten (Konformationsänderungen) Methode durch Hemmstoff- und Belichtungsversuche mit monochromatischem Licht nachgewiesen werden. Die ATP-Produktion im Licht erfolgt durch die nicht-zyklische PP. Auch nach Hemmung der nicht-zyklischen PP läuft unter aeroben Bedingungen keine zyklische PP ab.
2. Scenedesmus-Zellen besitzen aber unter anaeroben Bedingungen die Fähigkeit zur Durchführung einer zyklischen PP. Unter anaeroben Bedingungen können nicht-zyklische und zyklische PP (je nach Bedingungen) an der ATP-Produktion im Licht beteiligt sein, was ebenfalls mit beiden Methoden nachgewiesen werden konnte.
3. In einer $N_2 + CO_2$ -Atmosphäre können sich nicht-zyklische und zyklische PP gegenseitig voll ersetzen. Es muß einen Regulationsort in der Elektronentransportkette geben, der die Umschaltung zwischen beiden Phosphorylierungen durchführt; wahrscheinlich handelt es sich dabei um das Plastochinon.
4. Die zyklische PP mündet im Plastochinon in die Elektronentransportkette ein. Dies zeigen Hemmversuche mit DCMU und DBMIB.
5. Eine zyklische PP kann aber auch in vivo unter aeroben Bedingungen auftreten, was Untersuchungen des Phosphorylierungspotentials bei der Scenedesmus-Mutante 6E, die nur PS I besitzt, beweisen.
6. In synchronen Scenedesmus- und Chlorella-Kulturen folgt das Phosphorylierungspotential, das ATP nur aus der nicht-zyklischen PP erhält, dem Verlauf der Photosyntheseaktivität und hat demnach ein Maximum zur 8. und ein Minimum zur 16., bzw. 18. Stunde.

7. Die Änderungen der zyklischen PP in synchronen Scenedesmus-Kulturen unter Stickstoff-Atmosphäre zeigen einen parallelen Verlauf zu denen der nicht-zyklischen PP. Dies beruht auf dem Engpaß in der Elektronentransportkette, der Reoxidierbarkeit des Plastochinons. Eine zyklische PP als zusätzlicher ATP-Lieferant zum Zeitpunkt des Photosynthese-Minimums ist auch von daher unwahrscheinlich.

8. Belichtung von Scenedesmus-Zellen bewirkt Struktur- und Volumenänderungen im Chloroplasten; sie schrumpfen. Das als Extinktionszunahme gemessene Signal ist biphasig. Beide Signaleile weisen in Bezug auf Lichtintensitäts- und Hemmstoffabhängigkeit, sowie in ihren Aktionsspektren auf einen engen Zusammenhang mit den photosynthetischen Primärprozessen hin.

a) Phase 1 zeigt Konformations- und Konfigurationsänderungen an; in dichten Zellsuspensionen kann eine echte Absorptionsänderung (520 nm-Absorptionsänderung) diesen Streulichteffect überlagern.

b) Phase 2 beruht auf Volumenänderungen des gesamten Chloroplasten und kann als Maß für die Änderungen des Phosphorylierungspotentials im Chloroplasten dienen. Unter aeroben Bedingungen ist an der Potentialerhöhung in autotrophen Kulturen nur die nicht-zyklische PP beteiligt. Unter anaeroben Bedingungen kann auch die zyklische PP eine Extinktionszunahme bewirken.

9. In synchronen Scenedesmus-Kulturen hat Phase 1 ein Maximum zur 18. Stunde der Dunkelzeit, während sie in der Lichtzeit konstant bleibt. Diese, vom Entwicklungszustand der Zelle abhängigen unterschiedlichen strukturellen Veränderungen der Thylakoidmembranen könnten die Ursache für die Änderungen im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Photosynthese sein.

7. LITERATUR

- ARNON, D.I., WHATLEY, F.R. & ALLEN, M.B. (1957): Triphosphorydine nucleotide as a catalyst of photosynthetic phosphorylation.- *Nature* 180: 182-185
- , LOSADA, M., WHATLEY, F.R., TSUJIMOTO, H.Y., HALL, D.O. & HORTON, A.A. (1961): Photosynthetic phosphorylation and molecular oxygen.- *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 47: 1314-1334
- , TSUJIMOTO, H.Y. & McSWAIN, B.D. (1964): Role of Ferredoxin in photosynthetic production of oxygen.
a) Phosphorylation by chloroplasts.- *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 51: 1274-1282
- AVRON, M. & CHANCE, B. (1966): Relation of phosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts.- In: *Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus*. Brookhaven Symposium Biol. 19: 149-160
- & NEUMANN, J. (1968): Photophosphorylation in chloroplasts.- *Ann.Rev.Plant Physiol.* 19: 137-166
- BALTSCHIEFFSKY, M. & HALL, D.O. (1974): Photophosphorylation and the 518 nm absorbance change in tightly coupled chloroplasts.- *FEBS-Letters* 39: 345-348
- BARBER, J. (1968): Light induced uptake of potassium and chloride by Chlorella pyrenoidosa.- *Nature* 217: 876- 878
- BEDELL, G.W. & GOVINDJEE (1973): Photophosphorylation in intact algae: Effects of inhibitors, intensity of light, electron acceptor and donors.- *Plant Cell Physiol.* 14: 1081-1097
- BEN-AMOTZ, A. & GINZBURG, B.Z. (1969): Light-induced proton uptake in whole cells of Dunaliella parva.- *Biochim.Biophys.Acta* 183: 144-154

- BERZBORN, R.I. & BISHOP, N.I. (1973): Isolation and properties of chloroplast particles of Scenedesmus obliquus D3 with high photochemical activities.- *Biochim.Biophys.Acta* 292: 700-714
- BIGGINS, J. (1974): The role of plastoquinone in the in vivo photosynthetic electron transport pathway in algae.- *FEBS-Letters* 38: 311-314
- BISHOP, N.I. (1958): The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis.- *Biochim.Biophys.Acta* 27: 205-206
- (1971): Preparation and properties of mutants: Scenedesmus.- In: A.SAN PIETRO (ed.), *Photosynthesis, Methods in Enzymology*, Vol. XXIII: 130-142
 - (1971 b): Photosynthesis: The electron transport system of green plants.- *Ann.Rev.Biochemistry* 40: 197-226
 - (1973): Analysis of photosynthesis in green algae through mutation studies.- In: *Current Topics in Photobiology and Photochemistry. Photophysiology*, Vol. III: 65-96, Academic Press, New York and London
 - & SENGEL, H. (1971): Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus.- In: A.SAN PIETRO (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. XXIII: 53-66, Academic Press, New York and London
 - -- (1972): The development of structure and function in chloroplasts of greening mutants of Scenedesmus. II. Development of the photosynthetic apparatus.- *Plant Cell Physiol.* 13: 937-953
- BÖHME, H. & CRAMER, W.A. (1972): Localisation of a site of energy coupling between plastoquinone and cytochrome f in the electron-transport chain of spinach chloroplasts.- *Biochemistry* 11: 1155-1160

- -- (1972 b): The role of cytochrome b_6 in cyclic electron transport: evidence for an energy-coupling site in the pathway of cytochrome b_6 -oxidation in spinach chloroplasts.- Biochim.Biophys. Acta 283: 302-315
- -- (1973): Uncoupler dependent decrease in midpoint potential of the chloroplast cytochrome b_6 .- Biochim.Biophys.Acta 325: 274-283
- ,REIMER,S. & TREBST,A. (1971): The effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone, on noncyclic electron flow systems in isolated chloroplasts.- Z.Naturforsch. 26b: 341-351
- BORNEFELD,T. & SIMONIS,W. (1974): Effects of light, temperature, pH, and inhibitors on the ATP level of the blue green alga Anacystis nidulans.- Planta 115: 309-318
- CHAMPIGNY,M.L. & GIBBS,M. (1969): Photosynthesis by isolated chloroplasts in the presence of Antimycin A and ascorbic acid.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.III: 1534-1537, Tübingen
- CHANCE,B. (1972): The nature of electron transfer and energy coupling reactions.- FEBS-Letters 23: 3-20
- CRAMER,W.A. & BÖHME,H. (1972): High-potential cytochrome b_{559} as a secondary quencher of chloroplast fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea.- Biochim.Biophys.Acta 256: 358-369
- DEAMER,D.W., CROFTS,A.R. & PACKER,L. (1967): Mechanism of light-induced structural changes in chloroplasts. I. Light scattering increments and ultrastructural changes mediated by proton transport.- Biochim.Biophys.Acta 131: 81-96
- DEL CAMPO,F.F., RAMIREZ,J.M. & ARNON,D.I.(1968): Stoichiometry of photosynthetic phosphorylation.- J.Biol. Chem. 243: 2805-2809

- DENBURG, J.L., LEE, R.T. & McELROY, W.D. (1969): Substrate-binding properties of firefly luciferase. I. Luciferin-binding site.- Arch.Biochem.Biophys. 134: 381-394
- DILLEY, R.A. (1966): Ion and water transport processes in spinach chloroplasts.- In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus. Brookhaven Symposium Biol.19: 258-279
- & SHAVIT, N. (1968): On the relationship of H^+ transport to photophosphorylation in spinach chloroplasts.- Biochim.Biophys.Acta 162: 86-96
- & VERNON, L.P. (1964): Changes in light absorption and light scattering properties of spinach chloroplasts upon illumination: Relationship to phosphorylation.- Biochemistry 3: 817-824
- -- (1965): Ion and water transport processes related to the light-dependent shrinkage of spinach chloroplasts.- Arch.Biochem. 111: 365
- DRECHSLER, Z., NELSON, N. & NEUMANN, J. (1969): Antimycin A as an uncoupler and electron transport inhibitor in photoreactions of chloroplasts.- Biochim.Biophys. Acta 189: 65-73
- DUYSENS, L.N.M. & SWEERS, H.E. (1963): Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence.- In: Japan.Soc.Plant Physiologists (eds.), Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria: 353-372, Tokyo
- FORK, D.C. & URBACH, W. (1966): Studies made in vivo on the role of plastocyanine in photosynthesis.- In: J.B. THOMAS & GOEDHEER (eds.), Current in Photosynthesis: 293-300, Donker Publ., Rotterdam
- FORTI, G., AVRON, M. & MELANDRI, A. (eds.) (1972): Proc. 2nd Intern.Congr. on Photosynthesis Research, Stresa 1971, Vol.II, Photophosphorylation. W.Junck Publ., The Hague

- & JAGENDORF, A.T. (1961): Photosynthetic phosphorylation in the absence of redox dyes: oxygen and ascorbate effects.- *Biochim.Biophys.Acta* 54: 322-330
 - & PARISI, B. (1963): Evidence for the occurrence of cyclic phosphorylation in vivo.- *Biochim.Biophys.Acta* 71: 1-6
 - & ROSA, L. (1972): Cyclic photophosphorylation.- In: G.Forti et al. (eds.), *Proc.2nd Int.Congr. on Photosynthesis Research*: 1261-1270, W. Junck Publ., The Hague
 - & ZANETTI, G. (1969): The electron pathway of cyclic photophosphorylation.- In: H.METZNER (ed.), *Progress in Photosynthesis Research*, Vol.III: 1213-1216, Tübingen
- FRICKEL-FAULSTICH, B. (1974): Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyklus.- Dissertation, Marburg
- ,SCHÄFER, M., SENGER, H. & WERTHMÜLLER, K. (1974): Regulation der Photophosphorylierung photoautotropher Mikroorganismen.- SFB-Bericht 1974, unveröffentlicht
 - & SENGER, H. (1972): Änderungen der DCMU-Empfindlichkeit während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus.- *Ber.Dtsch.Bot.Ges.* 85: 401-408
- GIBBS, M., ELLYARD, P.W. & LATZKO, E. (1968): Warburg effect: Control of photosynthesis by oxygen.- In: K.SHIBATA et al. (eds.), *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis*: 387-399, Univ. Tokyo Press, Tokyo
- GIMMLER, H. (1973): Correlations between photophosphorylation and light-induced conformational changes of chloroplasts in whole cells of the halophilic alga Dunaliella parva.- *Z.Pflanzenphysiol.* 68: 289-307
- ,NEIMANIS, S., EILMANN, I. & URBACH, W. (1971): Photophosphorylation and photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ -fixation during the synchronous life cycle of Ankistrodesmus braunii.- *Z.Pflanzenphysiol.* 64: 358-366

- ,SIMONIS,W. & URBACH,W. (1969): Differential effect of Dio-9 on noncyclic photophosphorylation and $^{14}\text{CO}_2$ -fixation in vivo.- Naturwiss. 56: 371-372
- ,URBACH,W., JESCHKE,W.D. & SIMONIS,W. (1968): Die unterschiedliche Wirkung von Disalicylidenpropan-diamin auf die cyclische und nichtcyclische Photo-phosphorylierung in vivo sowie auf die ^{14}C -Markierung einzelner Photosyntheseprodukte.- Z.Pflanzenphysiol. 58: 353-364
- GOOD,N.E. & IZAWA,S. (1973): Inhibition of photosynthesis.- In: R.M.HOCHSTER et al. (eds.), Metabolic Inhibitors, Vol.IV, Academic Press, New York and London
- GRANT,G.R. & WHATLEY,F.R. (1967): Some factors affecting the onset of cyclic photophosphorylation.- In: T.W.GOOD-WIN (ed.), Biochemistry of chloroplasts, Vol.II: 505-521, Academic Press, New York and London
- GROMET-ELHANAN,Z. (1969): Two types of cyclic electron transport in isolated chloroplasts.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.III: 1197-1202, Tübingen
- & AVRON,M. (1965): Effect of inhibitors and uncouplers on the separate light and dark reactions in photophosphorylation.- Plant Physiol. 40: 1053-1059
- GROSS,E. & PACKER,L. (1965): Osmotic and light-induced volume changes in chloroplast membrane fragments.- Biochim.Biophys.Acta 20: 715-719
- HAGER,A. (1969): Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung.- Planta 89: 224-243
- HAUSKA,G.A., MCCARTHY,R.E. & RACKER,E. (1970): The site of phosphorylation associated with photosystem I. Biochim.Biophys.Acta 197: 206-218

- HEBER, U. (1969): Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo.- *Biochim.Biophys.Acta* 180: 302-319
- (1970): Adenylattransport zwischen Chloroplasten und Cytoplasma.- *Ber.Dtsch.Bot.Ges.* 83: 447-450
- (1973): Elektronentransport zum Sauerstoff und ATP-Verbrauch in der Photosynthese.- *Ber.Dtsch.Bot.Ges.* 86: 187-195
- (1973 b): Stoichiometry of reduction and phosphorylation during illumination of intact chloroplasts.- *Biochim.Biophys.Acta* 305: 140-152
- (1974): Metabolic exchange between chloroplast and cytoplasm.- *Ann.Rev.Plant Physiology* 25: 393-421
- & FRENCH, C.S. (1968): Effects of oxygen on the electron transport chain of photosynthesis.- *Planta* 79: 99-112
- & KIRK, M.R. (1975): Flexibility of coupling and stoichiometry in intact chloroplasts.- *Biochim.Biophys.Acta* 376: 136-150
- HELDT, H.W. (1969): Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts.- *FEBS-Letters* 5: 11-14
- & RAPLEY, L. (1970): Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetone phosphate, and of dicarboxylic acid anions in spinach chloroplasts.- *FEBS-Letters* 10: 143-148
- & WERDAN, K. (1973): pH-Änderungen im Chloroplastenstroma, erzeugt durch energieabhängigen Protonentransport über die Thylakoidmembran.- *Ber.Dtsch.Bot.Ges.* 86: 203-208
- HILGENHEGER, H. & MENKE, W. (1965): Lichtabhängige, anisotrope Veränderungen des Chloroplastenvolumens in lebenden Zellen.- *Z.Naturforsch.* 20b: 699-701
- HIND, G. & JAGENDORF, A.T. (1965): Light scattering changes associated with the production of a possible intermediate in photophosphorylation.- *J.Biol.Chem.* 240: 3195-3201

- -- (1965): Effect of uncouplers on the conformational and high energy states of chloroplasts.- J.Biol. Chem. 240: 3202-3209
- & OLSON, J.M. (1966): Light-induced changes in cytochrome b_6 in spinach chloroplasts.- Brookhaven Symp. Biol. 19: 188-194
- HIRT, G. & TANNER, W. (1972): Regulation of glycolysis by light in Scenedesmus.- In: G.FORTI et al. (eds.), Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research: 1989-1997, W. Junck Publ., The Hague
- HOCH, G., OWENS, O.V.H. & KOK, B. (1963): Photosynthesis and respiration.- Arch. Biochem. Biophys. 101: 171-180
- HOLM-HANSEN, O. (1970): ATP-levels in algal cells as influenced by environmental conditions.- Plant Cell Physiol. 11: 689-700
- ITOH, M., IZAWA, S. & SHIBATA, K. (1963): Shrinkage of whole chloroplasts upon illumination.- Biochim. Biophys. Acta 66: 319-327
- IZAWA, S., CONNOLLY, T.N., WINGET, G.D. & GOOD, N.E. (1966): Inhibition and uncoupling of photophosphorylation in chloroplasts.- In: Brookhaven Symp. Biol. 19: 169-187
- & GOOD, N.E. (1966): Effects of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. I. Light scattering and volume changes. II. Electron microscopy. Plant Physiol. 41: 533-552
- JACKSON, W.A. & VOLK, R.J. (1969): Oxygen uptake by illuminated maize leaves.- Nature 222: 269-271
- -- (1970): Photorespiration.- Ann. Rev. Plant Physiol. 21: 384-432
- JAGENDORF, A.T. & NEUMANN, J. (1965): Effect of uncouplers on the light-induced pH rise with spinach chloroplasts.- J. Biol. Chem. 240: 3210-3214

- & URIBE, E. (1967): Photophosphorylation and the chemiosmotic hypothesis.- In: Brookhaven Symp.Biol. 19: 215-245
- JESCHKE, W.D. & SIMONIS, W. (1969): Über die Wirkung von CO_2 auf die lichtabhängige Cl^- -Aufnahme bei Elodea densa: Regulation zwischen nichtcyclischer und cyclischer Photophosphorylierung.- Planta 88: 157-171
- JOLIOT, P. & DELOSME, R. (1974): Flash-induced 519 nm absorption change in green algae.- Biochim.Biophys. Acta 357: 267-284
- JONES, P.C.T. (1970): The effect of light, temperature and anaesthetics on ATP-levels in the leaves of Chenopodium rubrum and Phaseolus vulgaris.- J.exp.Bot. 21: 58-63
- JUNGE, W., SCHLIEPHAKE, W.D. & WITT, H.T. (1969): Experimental evidence for the chemiosmotic hypothesis.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.III: 1383-1391, Tübingen
- & WITT, H.T. (1968): On the transport system of photosynthesis. Investigations on a molecular level.- Z.Naturforsch. 23 b: 244-254
- KAISER, W. & URBACH, W. (1972): Endogene cyclische Photophosphorylierung in isolierten Chloroplasten.- Ber. Dtsch.Bot.Ges. 86: 213-226
- -- (1974): Probleme der quantitativen Untersuchung der endogenen Photophosphorylierung in isolierten intakten Chloroplasten.- Ber.Dtsch.Bot.Ges. 87: 145-154
- KANAZAWA, T., KANAZAWA, K., KIRK, M.R. & BASSHAM, J.A. (1970): Regulation of photosynthetic carbon metabolism in synchronous growing Chlorella pyrenoidosa.- Plant Cell Physiol. 11: 149-160
- KANDLER, O. & TANNER, W. (1966): Die Photoassimilation von Glucose als Indikator für die Lichtphosphorylierung in vivo.- Ber.Dtsch.Bot.Ges. 79: (48)-(57)

- KAUROV, B.S., KRENDELEVA, T.E. & RUBIN, A.B. (1974): Light-induced absorption changes in pea chloroplasts in the blue-green spectral region.- *Photosynthetica* 8: 353-359
- KESSLER, E., ARTHUR, W. & BRUGGER, J.E. (1957): The influence of manganese and phosphate on delayed light emission, fluorescence, photoreduction, and photosynthesis in algae.- *Arch.Biochem.* 71: 326-335
- KLOB, W., TANNER, W. & KANDLER, O. (1972): Cyclic photophosphorylation and changes of inorganic phosphate in Chlorella.- In: G.FORTI et al. (eds.), *Proc.2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research: 1998-2010*, W.Junck Publ., The Hague
- KRATZ, W.A. & MYERS, J. (1955): Nutrition and growth of several blue-green algae.- *Amer.J.Bot.* 42: 282-287
- KRAUSE, G.H. (1973): Einfluß des Sauerstoffs auf den Energiezustand der belichteten Blattzelle.- *Ber.Dtsch.Bot. Ges.* 86: 197-202
- (1973b): The high-energy state of the thylakoid system as indicated by chlorophyll fluorescence and chloroplast shrinkage.- *Biochim.Biophys.Acta* 292: 713-728
- & HEBER, U. (1971): Reaction of oxygen with the electron transport chain of photosynthesis.- In: E.BRODA et al. (eds.), *Proc.1st Eur.Biophys.Congr.*: 79-91, Wiener Med.Akad.
- KUHL, A. (1962): Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Polyphosphate in Chlorella.- In: *Beiträge Physiol.Morphol.Algen*: 157-166, Fischer-Verlag, Stuttgart
- & LORENZEN, H. (1964): Handling and culturing of Chlorella.- In: D.M.PRESCOTT (ed.), *Methods of Cell Physiology*, Vol.II: 159-188, Academic Press, New York and London
- KYLIN, A. & OKKEH, A. (1974): Titration of photophosphorylation: Oxidative phosphorylation and glycolysis in

- Scenedesmus with Desaspidin: Regulation between pathways and sites for photophosphorylation.- *Physiol. Plant.* 30: 58-63
- & TILLBERG, J.E. (1967): The relation between total photophosphorylation, level of ATP and oxygen evolution in Scenedesmus as studied with DCMU and Antimycin A.- *Z.Pflanzenphysiol.* 58: 165-174
- -- (1969): Light-induced phosphorylation and formation of ATP in Scenedesmus.- In: H.METZNER (ed.), *Progress in Photosynthesis Research*, Vol.III: 1224-1228, Tübingen
- , SUNDBERG, I. & TILLBERG, J.E. (1972): Titration with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) as evidence for several photophosphorylation sites in Scenedesmus.- *Z.Pflanzenphysiol.* 57: 72-78
- LARKUM, A.W.D. & BONNER, W.D. (1972): Light-induced absorbance changes of P_{518} in intact chloroplasts.- *Biochim.Biophys.Acta* 256: 396-408
- LEWENSTEIN, A. & BACHOFEN, R. (1972): Transient induced oscillations in the level of ATP in Chlorella fusca.- *Biochim.Biophys.Acta* 267: 80-85
- & SCHNEIDER, K. (1972): The level of ATP in Chlorella.- In: G.FORTI et al. (eds.), *Proc.2nd Int.Congr. on Photosynthesis Research*: 1371-1378, W.Junck, Publ., The Hague
- LOOS, E. (1974): Light-induced pH changes in chloroplast suspensions from a yellow-green alga.- *Photosynthetica* 8: 109-117
- LORENZEN, H. (1970): Synchronous cultures.- In: P.HALLDAL (ed.), *Photobiology of Microorganism*: 187-312, Wiley, London
- LÜTTGE, U., BALL, E. & WILLERT, K.v. (1971): Gas exchange and ATP levels of green cells of higher plants as affected by FCCP and DCMU in in vitro experiments.- *Z.Pflanzenphysiol.* 65: 326-335

- MARSHO, T.V. & HOMMERSAND, M.H. (1975): Slow 514nm absorption phases and oxygen exchange transients in Ulva.- Biochim.Biophys.Acta 376: 354-365
- MIGINIAC-MASLOW, M. (1971): Etude de la photophosphorylation endogène des chloroplastes isolés d'épinard.- Biochim.Biophys.Acta 234: 353-359
- & CHAMPIGNY, M.L. (1971): Relations entre l'assimilation photosynthétique du CO₂ et la photophosphorylation des chloroplastes isolés. II. L'utilisation de l'ATP dans l'assimilation photosynthétique du CO₂.- Biochim.Biophys.Acta 234: 344-352
- MITCHELL, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.- Nature 191: 144-148
- (1966): A chemi-osmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases.- FEBS-Letters 43: 189-194
- MOHANTY, P. & GOVINDJEE (1973): Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in Anacystis nidulans. I. Relationship of slow fluorescence changes with structural changes.- Biochim.Biophys.Acta 305: 95-104
- MURAKAMI, S. & PACKER, L. (1970): Light-induced changes in the conformation and configuration of the thylakoid membrane of Ulva and Porphyra chloroplasts in vivo.- Plant Physiol. 45: 289-299
- NEUMANN, J. & JAGENDORF, A.T. (1964): Light-induced pH-changes related to photophosphorylation by chloroplasts.- Arch.Biochem. 107: 109
- , YAMAI, Y., ARNTZEN, C.J. & DILLEY, R.A. (1972): Two sites for ATP formation in photosynthetic electron transport mediated by photosystem I. Evidence from digitonin subchloroplast particles and chloroplasts.- In: G.FORTI et al. (eds.), Proc.2nd Int.Congr. on Photosynthesis Research: 1271-1282, W.Junck Publ., The Hague

- NISHIDA, K. TAMAI, N. & RYOYAMA, K. (1966): Light-induced high amplitude swelling and shrinking in isolated spinach chloroplasts.- *Plant Cell Physiol.* 7: 415-428
- NOBEL, P.S. (1967): Relation of swelling and photophosphorylation to light-induced ion uptake by chloroplasts in vitro.- *Biochim. Biophys. Acta* 131: 127-140
- (1967b): A rapid technique for isolating chloroplasts with high rates of endogenous photophosphorylation.- *Plant. Physiol.* 42: 1389-1394
- (1969): Light-induced changes in the ionic content of chloroplasts in Pisum sativum.- *Biochim. Biophys. Acta* 172: 134-143
- NULTSCH, W. (1966): Correlations between photosynthesis, phototaxis and photokinesis in blue-green algae.- In: J.B. THOMAS & J.C. GOEDHEER (eds.), *Currents in Photosynthesis*: 421-430, A.D. Donker Publ., Rotterdam
- & BAI, J. (1966): Untersuchungen über den Einfluß von Photosynthese-Hemmstoffen auf das phototaktische und photokinetische Reaktionsverhalten blaugrüner Algen.- *Z. Pflanzenphysiol.* 54: 84-98
- OELZE-KAROW, H. & BUTLER, W.L. (1971): The development of photophosphorylation and photosynthesis in greening bean leaves.- *Plant Physiol.* 48: 621-625
- OKKEH, A., TILLBERG, J.E. & KYLIN, A. (1975): The effect of light intensity on total photophosphorylation and the ATP level in Scenedesmus.- *Physiol. Plant.* 33: 124-127
- PACKER, L. (1963): Structural changes correlated with photochemical phosphorylation in chloroplast membranes.- *Biochim. Biophys. Acta* 75: 12-22
- & CROFTS, A.R. (1967): The energized movements of ions and water by chloroplasts.- In: D.R. SANADI (ed.), *Current Topics in Bioenergetics*, Vol. II: 23-64, Academic Press, New York and London
- & DEAMER, D.W. (1969): Studies on the effect of light

- on chloroplast structure.- In: A.C.GIESE (ed.), Current Topics in Photophysiology, Vol.III: 91-123, Academic Press, New York and London
- ,DEAMER,D.W. & CROFTS,A.R. (1966): Conformational changes in chloroplasts.- In: Brookhaven Symp.Biol. 19: 281-302
- & MURAKAMI,S. (1972): Methods for the measurement of chloroplast volume in vitro and in vivo.- In: COLOWICK & KAPLAN (eds.), Methods in Enzymology, Vol. XXIV: 181-205, Academic Press, New York and London
- & SIEGENTHALER, P.A. (1965): Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts. II. Action of anions.- Plant Physiol. 40: 1080-1085
- ,SIEGENTHALER,P.A. & NOBEL,P.S. (1965): Light-induced volume changes in spinach chloroplasts.- J.Cell Biol. 26: 593-599
- PEDERSON,T., KIRK,M. & BASSHAM,J. (1966): Light-dark transients in levels of intermediate compounds during photosynthesis in air adapted Chlorella.- Physiol. Plant. 19: 219-231
- PENTH,B. & WEIGL,J. (1971): Anionen-Influx, ATP-Spiegel und CO₂-Fixierung in Limnophila gratioloides und Chara foetida.- Planta 96: 212-223
- PFAU,J., WERTHMÜLLER,K. & SENGER,H. (1971): Permanent automatic synchronization of micro algae achieved by photoelectrically controlled dilution.- Arch.Mikrobiol. 75: 338-345
- RAVEN,J.A. (1969): Effects of inhibitors on photosynthesis and the active influxes of K⁺ and Cl⁻ in Hydrodictyon africanum.- New Phytol. 68: 45-62
- (1970): The role of cyclic and pseudocyclic photophosphorylation in photosynthetic ¹⁴CO₂-fixation in Hydrodictyon africanum.- J.exp.Bot. 21: 1-16
- (1971): Cyclic and non-cyclic photophosphorylation as energy sources for active K⁺influx in Hydrodictyon africanum.- J.exp.Bot. 22: 420-433

- (1974): Photosynthetic electron flow and photophosphorylation.- In: W.D.P.STEWART (ed.), Algal Physiology and Biochemistry, Botanical Monograph, Vol. 10: 391-423, Blackwell Scientific Publ., Oxford, London, Edinburgh, Melbourne
- REEVES, S.G. & HALL, D.C. (1973): The stoichiometry of the (ATP/2e⁻ ratio) of non-cyclic photophosphorylation in isolated chloroplasts.- Biochim.Biophys.Acta 314: 66-78
- RENSSEN, J.J.S.van (1971): Action of some herbicides in photosynthesis of Scenedesmus as studied by their effects on oxygen evolution and cyclic photophosphorylation.- Meded.Landbouwhogeschool Wageningen 71: 9
- RIED, A. (1968): Interactions between photosynthesis and respiration in Chlorella.- Biochim.Biophys.Acta 153: 653-663
- SANTARIUS, K.A. & HEBER, U. (1965): Changes in the inter-cellular levels of ATP, ADP, AMP and P_i and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis.- Biochim.Biophys.Acta 102: 39-54
- SCHACTER, B. & BASSHAM, J.A. (1972): Antimycin A stimulation of rate-limiting steps of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts.- Plant Physiol. 49: 411-416
- SCHÄFER, M. & SENGER, H. (1974): Konformationsänderungen in Synchronkulturen von Scenedesmus.- Vortrag Botaniker-Tagung 1974, Würzburg, unveröffentlicht
- SCHLIEPHAKE, W., JUNGE, W. & WITT, H.T. (1968): Correlation between field formation, proton translocation, and the light reactions in photosynthesis.- Z.Naturforsch. 23 b: 1571-1578
- SCHMID, G. & NINNEMANN, H. (1971): Changes in the ATP level during the cell cycle of synchronized Chlorella pyrenoidosa.- Vortrag, 2nd Int.Photobiology Congress, Stresa, unveröffentlicht

- SCHÖNBOHM, E. (1969): Untersuchungen über den Einfluß von Photosynthesehemmstoffen und Halogeniden auf die Starklicht- und Schwachlichtbewegung des Chloroplasten von Mougeotia spec.- Z.Pflanzenphysiol. 60: 225-269
- SCHÜRMANN, P., BUCHANAN, B.B. & ARNON, D.I. (1971): Role of cyclic photophosphorylation in photosynthetic carbon dioxide assimilation by isolated chloroplasts.- Biochim.Biophys.Acta 267: 111-124
- SCHWARTZ, M. (1968): Light-induced proton gradient links electron transport and phosphorylation.- Nature 219: 915-919
- (1971): The relation of ion transport to phosphorylation.- Ann.Rev.Plant Physiol. 22: 469-484
- SENGER, H. (1970a): Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während des Entwicklungszyklus.- Planta 90: 243-266
- (1970b): Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyntheseapparates während des Entwicklungsablaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen.- Planta 92: 327-346
- (1971): Quantum yield of photosynthesis in synchronous cultures of algae.- In: E.BRODA et al. (eds.), Proc. 1st Europ.Biophys.Congr.: 33-36, Wiener Med.Akad.
- (1975): Changes in the photosynthetic activities in synchronous cultures of Scenedesmus, Chlorella and Chlamydomonas.- In: M.LEFORT-TRAN (ed.), Les Cycles Cellulaires et leur Blocage chez Plusieurs Protistes. Im Druck
- & BISHOP, N.J. (1968): Changes in the photosynthetic apparatus during the synchronous life cycle of Scenedesmus obliquus.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.I: 425-434, Tübingen

- --,WEHRMEYER,W. & KULANDAIVELU,G. (1975): Development of structure and photosynthetic apparatus during light-dependent greening of a mutant of Scenedesmus obliquus.- In: M.AVRON (ed.), Proc.3rd Int.Congr. on Photosynthesis: 1913-1923, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam
 - & FRICKEL-FAULSTICH,B. (1974): The regulation of electron flow in synchronized cultures of green algae.- In: M.AVRON (ed.), Proc.3rd Int.Congr. on Photosynthesis: 715-727, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam
 - & MELL,V. (1975): Preparation on photosynthetically active particles from synchronized cultures of unicellular algae.- im Druck
 - ,PFAU,J. & WERTHMÜLLER,K. (1972): Continuous cultivation of homocontinuous and synchronized microalgae.- In: D.M.PRESCOTT (ed.), Methods in Cell Physiology, Vol.V: 301-323, Academic Press, New York and London
- SHAVIT,N. & AVRON,M. (1967): The relation of electron transport and photophosphorylation to conformational changes in chloroplasts.- Biochim.Biophys.Acta 131: 516-525
- SHIBATA,K. (1972): Measurement of size distribution with the Coulter Counter.- In: COLOWICK & KAPLAN (eds.), Methods in Enzymology, Vol.XXIV: 171-181, Photosynthesis and Nitrogen Fixation, Part B, Academic Press New York and London
- SIEGENTHALER,P.A. (1969): Vieillissement de l'appareil photosynthétique. I. Effect synergique de la lumière et du vieillissement in vitro sur les changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard.- Plant Cell Physiol. 10: 801-810
- SIMONIS,W. (1964): Untersuchungen zur Photosynthese-Phosphorylierung an intakten Algenzellen (Ankistrodesmus braunii).- Ber.Dtsch.Bot.Ges. 77: (5)-(13)

- (1967): Zyklische und nichtzyklische Photophosphorylierung in vivo.- Ber.Dtsch.Bot.Ges. 80: 395-402
- & GIMMLER,H. (1969): Effect of inhibitors of photophosphorylation on light-induced dark incorporation of ^{32}P in Ankistrodesmus braunii.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.III: 1155-1161, Tübingen
- & URBACH,W. (1973): Photophosphorylation in vivo.- Ann.Rev.Plant Physiol. 24: 89-114
- SLATER,E.C. (1967): An evaluation of Mitchell hypothesis of chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.- Europ.J.Biochem. 1: 317-326
- SOROKIN,C. & KRAUSS,R.W. (1961): Relative efficiency of photosynthesis in the course of cell development.- Biochim.Biophys.Acta 48: 314-319
- STRASSER,R.J., RÜGGERBERG,B. & METZNER,H. (1970): Licht-induzierte Größenveränderungen bei Chlorella.- Verh. Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft 1970: 156-158
- STREHLER,B. (1962): Adenosin-5-triphosphat und Creatinphosphat-Bestimmung mit Luciferase.- In: H.U.BERGMEYER (ed.), Methoden der enzymatischen Analyse: 559-572, Verlag Chemie, Weinheim
- TAGAWA,K., TSUJIMOTO,H.Y. & ARNON,D.I. (1963a): Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis.- Proc.Nat.Acad.Sci.USA 49: 567-572
- -- (1963b): Analysis of photosynthetic reactions by the use of monochromatic light.- Natur 199: 1247-1252
- TAMAI,N. (1970): Volume changes of isolated spinach chloroplasts on illumination in the presence of phenazine methosulfate.- Plant Cell Physiol. 11: 957-970

- TANNER, W., DÄCHSEL, L. & KANDLER, O. (1965): Effects of DCMU and Antimycin A on photoassimilation of glucose in Chlorella.- Plant Physiol. 40: 1151-1156
- & KANDLER, O. (1969): The lack of relationship between cyclic photophosphorylation and photosynthetic CO₂-fixation.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol. III: 1217-1223, Tübingen
- , LÖFFLER, M. & KANDLER, O. (1969): Cyclic photophosphorylation in vivo and its relation to photosynthetic CO₂-fixation.- Plant Physiol. 44: 422-428
- , LOOS, E. & KANDLER, O. (1966): Glucose assimilation of Chlorella in monochromatic light of 658 and 711 mμ.- In: J.B.THOMAS & J.C.GOEDHEER (eds.), Currents in Photosynthesis: 243-251, Donker Publ., Rotterdam
- , LOOS, E., KLOB, W. & KANDLER, O. (1969): The quantum requirement for light dependent anaerobic glucose assimilation by Chlorella vulgaris.- Z.Pflanzenphysiol. 59: 301-303
- TEICHER-ZALLEN, D. & HOCH, G. (1967): Cyclic electron transport in algae.- Arch.Biochem.Biophys. 120: 227-230
- THIEL, A. & STROTMANN, H. (1974): Entkopplung der Photophosphorylierung und Entkoppler-Transport über die Thylakoidmembran.- Ber.Dtsch.Bot.Ges. 87: 129-133
- TISCHNER, R. (1974): Physiologische Veränderungen synchroner Chlorella nach Hitzebehandlung unter besonderer Berücksichtigung der hitzeempfindlichsten Phase.- Dissertation, Göttingen
- TREBST, A. (1974): Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts.- Ann.Rev.Plant Physiol. 25: 423-428
- , HARTH, E. & DRABER, S. (1970): On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts.- Z.Naturforsch. 25b: 1157-1159

- & HAUSKA, G. (1974): Energiekonservierung in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten.- Naturwissenschaften 61: 308-316
- & REIMER, S. (1973): Properties on photoreductions by photosystem II in isolated chloroplasts. An energy-conserving step in the photoreduction of benzoquinones by photosystem II in the presence of dibromothymoquinone.- Biochim.Biophys.Acta 305: 129-139
- ULLRICH, W. R. (1970): Zur Wirkung von Sauerstoff auf die ^{32}P -Markierung von Polyphosphaten und organischen Phosphaten bei Ankistrodesmus braunii im Licht.- Planta 90: 272-285
- (1972): Der Einfluß von CO_2 und pH auf die ^{32}P -Markierung von Polyphosphaten und organischen Phosphaten bei Ankistrodesmus braunii im Licht.- Planta 102: 37-54
- & SIMONIS, W. (1969): Die Bildung von Polyphosphaten bei Ankistrodesmus braunii durch Photophosphorylierung im Rotlicht von 683 und 712 nm unter Stickstoffatmosphäre.- Planta 84: 358-367
- URBACH, W. & GIMMLER, H. (1970): Das Verhalten der cyclischen und nichtcyclischen Photophosphorylierung während des Entwicklungszyklus von Ankistrodesmus braunii.- Ber. Dtsch.Bot.Ges. 83: 439-442
- -- (1970): Photophosphorylierung und photosynthetische $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in vivo. I. Vergleich von cyclischer und nichtcyclischer Photophosphorylierung mit der photosynthetischen $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung.- Z.Pflanzenphysiol. 62: 276-286
- & KAISER, W. (1972): Changes of ATP levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reactions.- In: G.FORTI et al. (eds.), Proc. 2nd Int.Congr.on Photosynthesis Research: 1401-1411, W.Junck Publ., The Hague

- & SIMONIS, W. (1964): Inhibitor studies on the photo-phosphorylation in vivo by unicellular algae (Ankistrodesmus) with Antimycin A, HOQNO, Salicylaldoxim, and DCMU.- Biochem.Biophys.Res.Comm. 17: 39-45
- -- (1967): Further evidence for the existence of cyclic and noncyclic photophosphorylation in vivo by means of Desaspidin and DCMU.- Z.Naturforsch. 22b: 537-540
- WELSCH, F. & SMITH, L. (1969): Kinetics of synthesis and utilization of adenosine triphosphate by intact cells of Rhodospirillum rubrum.- Biochemistry 8: 3403-3408
- WERTHMÜLLER, K. (1975): Stoffwechseländerungen und Photosyntheseleistung in autotrophen, mixotrophen und photo-heterotrophen Synchron-Kulturen einzelliger Grünalgen.- Dissertation, Marburg
- & SENGER, H. (1974): Changes in the photosynthetic apparatus of autotrophic, mixotrophic and photo-heterotrophic synchronized cultures of Scenedesmus.- In: M.AVRON (ed.), Proc.3rd Int.Congr. on Photosynthesis: 1969-1975, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam
- WEST, K.R. & WISKICH, J.T. (1973): Evidence for two phosphorylation sites associated with the electron transport chain of chloroplasts.- Biochim.Biophys.Acta 292: 197-202
- WIEGAND, H. (1974): Das lichtinduzierte Schrumpfen und Schwellen von Chloroplasten in lebenden Blättern, ihre Beeinflussbarkeit durch Herbizide und ihre Beziehungen zum Fluoreszenzverhalten des Chlorophylls.- Diplomarbeit, Aachen
- WIESSNER, W. (1965): Quantum requirement for acetat assimilation and its significance for quantum measurements in phosphorylation.- Nature 205: 56-57
- YAMASHITA, T. & BUTLER, W.L. (1969): Electron-donation to Tris-washed chloroplasts by artificial electron do-

nors.- In: H.METZNER (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol.III: 1236-1240, Tübingen

ZELITCH, I. (1971): Environmental and physiological control of net photosynthesis in single leaves.- In: I.ZELITCH (ed.), Photosynthesis, Photorespiration, and Plant Productivity, Academic Press, New York and London

ZIMMERMANN, U. & DAINITY, J. (eds.) (1974): Membrane Transport in Plants.- Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

ZURZYCKI, J. (1974): The effect of blue and red radiation on the volume changes of Funaria chloroplasts in vivo.- Photosynthetica 8: 338-343

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof.Dr.H.Senger für die Themenstellung und die Betreuung der Arbeit danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau A.Altmann für die Mit-
hilfe bei der Durchführung einiger Experimente, Frau
J.Caspar für das Tippen der Arbeit, der Arbeitsgruppe
H.Senger, besonders Herrn K.Werthmüller, für anregen-
de Diskussionen und schließlich allen Angehörigen des
Fachbereiches Biologie -Botanik-, die mich bei meinen
Arbeiten unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde durch Mittel des Sonderforschungs-
bereiches 103 der Deutschen Forschungsgemeinschaft ge-
fördert, der an dieser Stelle ebenfalls gedankt sei.

Lebenslauf

Am 13.März 1948 wurde ich in Bad Salzschlirf geboren. Meine Eltern sind der Sparkassenbeamte Karl Möller und seine Ehefrau Maria, geborene te Kamp.

Die Volksschule besuchte ich von 1954 bis 1958 in Bad Salzschlirf und anschließend die Marienschule (Gymnasium für Mädchen) in Fulda. Dort legte ich am 3.November 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Philipps-Universität Marburg das Studium der Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien. Im November 1972 bestand ich das Staatsexamen.

Im Januar 1973 begann ich mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation bei Prof.Dr.H.Senger.

Seit 1973 bin ich verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren:

Anderson, Bishop, Buchholtz, Cleffmann, Dimroth, Froese, Hahn, Hellner, Henßen, Huckriede, Kamper, Karlson, Kellner, Kessel, Klafki, Koch, Koecke, Kowallik, Lenski, Lindström, Lohse, Ludwig, Lütke, Mattes, Nöth, Nultsch, Pfeil, Remane, Schäfer, Wo.Schmidt, Schmitz, Scriba, Seidel, Seidelmann, Senger, v.Stosch, Stuke, Walcher, Wehrmeyer, Werner, Witzel, Zedlitz, Ziegler.

